

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX
LIGNOCELLULOSIQUES

PAR
TARIK JABRANE

MÉTHODOLOGIES DE FABRICATION DE PAPIER BIOACTIF

JUILLET 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Cette thèse a été dirigée par :

M. Patrice J. Mangin, Ph.D., directeur de recherche	Université du Québec à Trois-Rivières
---	---------------------------------------

Jury d'évaluation de la thèse :

M. Patrice J. Mangin, Ph. D., directeur de recherche	Université du Québec à Trois-Rivières
--	---------------------------------------

M. François Brouillette, Ph. D., président du jury	Université du Québec à Trois-Rivières
--	---------------------------------------

Mme Hélène-Marie Thérien, Ph. D., évaluatrice	Université du Québec à Trois-Rivières
---	---------------------------------------

M. Martin Dubé, Ph. D., évaluateur externe	Cégep de Trois-Rivières
--	-------------------------

M. Dominic Rochefort, Ph. D., évaluateur externe	Université de Montréal
--	------------------------

Thèse soutenue le 17 12 2014

À mon épouse Chrystelle,

À mes enfants Adam, Lina et Nora,

À mes parents et à ma famille.

Avant-propos

L'objectif de la thèse est d'étudier la faisabilité de fabrication industrielle d'un emballage bioactif pour le contrôle de bactéries pathogènes, afin de lutter contre les contaminations alimentaires. Pour atteindre cet objectif, nous avons conçu un plan expérimental en deux phases qui représentent respectivement l'utilisation de l'enzyme HRP et des phages T4. Nous avons étudié l'effet des principaux paramètres de fabrication de papiers bioactifs sur l'efficacité des papiers bioactifs. Nous avons favorisé une approche de fabrication efficace et économiquement viable, en utilisant des agents bioactifs peu dispendieux, une méthode d'immobilisation transférable à l'échelle industrielle, et des procédés de fabrication conventionnels déjà existants dans les usines papetières.

La première phase consiste à développer une méthode d'immobilisation des enzymes à la surface du papier. Tout d'abord, une bio-encre à base d'enzymes HRP est formulée, et le taux de transfert de la bio-encre est optimisé en tenant compte des propriétés du papier de base, de la formulation de la bio-encre et du procédé de fabrication utilisé. La bioactivité du papier bioactif est ensuite quantifiée par colorimétrie. La résistance des enzymes aux contraintes d'impression gravure est examinée en étudiant l'influence de la viscosité de la bioencre, de la vitesse et de la pression d'impression. L'influence du temps de stockage de la bioencre et des conditions de stockage des papiers bioactifs à base d'enzymes est aussi réalisée. La deuxième phase consiste au développement d'une méthode de fabrication de papier bioactif à base de phages pour le contrôle de bactéries. Une bioencre à base de phages T4 est formulée et imprimée sur le papier. Une méthode de quantification de la bioactivité du papier bioactif à base de phages est développée. La résistance des phages aux contraintes d'impression gravure est examinée en étudiant l'influence de la vitesse et de la pression d'impression. La résistance des phages aux contraintes de couchage à lame est aussi examinée en étudiant l'influence de la vitesse et de la pression de couchage, ainsi que l'influence de la viscosité de la sauce de couchage. L'influence de l'humidité sur l'efficacité des papiers bioactifs est étudiée. L'influence de la nature d'immobilisation des phages est étudiée en appliquant une précouche cationique à la surface du papier. L'influence de l'emplacement des phages sur le papier est étudiée en examinant l'effet de la porosité du papier sur la bioactivité des papiers.

Remerciements

Le papier bioactif a été identifié par *The New York Times Magazine* comme l'une des 70 meilleures idées de l'année 2007. J'ai donc eu le privilège de travailler sur un sujet de recherche d'actualité, à la fois passionnant et novateur. Cette thèse de doctorat m'a permis de réaliser un rêve de jeune chercheur : développer un produit de grande consommation ayant un impact bénéfique sur notre société.

Ce travail n'aurait pas pu être finalisé sans le soutien de nombreuses personnes.

Je remercie mon directeur de recherche Professeur Patrice J. Mangin pour sa confiance, sa patience, et son aide dans les moments parfois plus difficiles de ce travail. Il a été mon mentor, mon coach, mon accompagnateur et mon inconditionnel allié à toutes les étapes de développement personnel tout au long de ce projet. J'ai particulièrement apprécié son dévouement et le temps qu'il m'a consacré au cours de cette thèse. J'ai beaucoup appris de ses qualités de sincérité, de délégation, d'écoute, de confiance, de générosité, d'empathie et de respect. Il m'a poussé vers le haut comme nulle autre personne. Je lui dois une grande part de mon développement personnel et professionnel et je suis heureux d'avoir conquis son amitié.

Je remercie l'équipe du réseau CRSNG pancanadien Sentinel. Leurs conseils, suggestions et nombreuses discussions m'ont beaucoup aidé dans mon travail. Je remercie notamment professeur Robert H. Pelton, directeur scientifique, pour sa vision du papier bioactif dont il est le précurseur. Je remercie également professeur Mansel W. Griffiths, Centre de Recherche Canadien de Sécurité Alimentaire (CRIFS), Université de Guelph et son équipe, notamment Luba Brovko et Hany Anany pour leur collaboration et leurs conseils relatifs à l'utilisation des bactériophages. Je tiens aussi à remercier professeur Richard J. Kerekes pour ses suggestions en science des matériaux.

Je remercie chaleureusement Martin Dubé pour son soutien à la réalisation de cette recherche. Il m'a beaucoup conseillé sur la rédaction d'articles et de communications scientifiques. Merci Martin, pour ton aide, et plus particulièrement pour les calculs d'estimation des contraintes de cisaillement subies par les agents bioactifs.

Des remerciements sont dus à toute l'équipe de la chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie CRIEB du professeur Simon Barnabé de l'UQTR, notamment pour l'utilisation des divers équipements microbiologiques. La personnalité de professeur Simon Barnabé m'a particulièrement inspiré. Me considérant comme membre de son équipe, il m'a montré que tout était possible. Merci plus spécifiques aux membres de l'équipe, notamment Lai *Thanh* Tung, Kokou Adjallé, Karine, Mélissa, Nathalie, et les autres membres de la CRIEB pour les moments agréables que j'ai passé avec vous au laboratoire.

Toujours à l'UQTR, je remercie Micheline Boulianne et Marie-Ève Lemire du département de chimie-biologie pour leur précieuse aide en microbiologie expérimentale et leur soutien apporté durant les années de ma thèse. Vous m'avez non seulement appris les bases des méthodes microbiologiques mais vous m'avez surtout transmis votre passion pour le sujet. Mes remerciements vont aussi à professeur François Brouillette pour ses conseils lors de l'utilisation de poly-électrolytes. Je tiens finalement à remercier Jawad Jaïdi et Meije Laloi, stagiaires de Pagora, pour leur contribution à ce travail.

Un très gros merci à toute l'équipe d'Innofibre, le Centre d'Innovation des Produits celluloseux du Cégep de Trois-Rivières. Je tiens tout particulièrement à remercier Mario Parenteau, Sylvain Duquette, Jean-Patrice Lamothe, Gaston Michaud, Jean Paradis et Lily Laverdière : vous m'avez partagé votre expertise et votre savoir et vous m'avez inspiré par vos valeurs professionnelles de respect et d'esprit d'équipe. Merci notamment à Annie Trudeau, Daniel Thiboutot, Isabelle Gagné, Michel Proulx, Josée Doucet, Simon Fréchette Gélinas, Yves Grenier, et ceux que j'aurai pu oublier. Il me faut ici mentionner les nombreux équipements et matériaux d'Innofibre, toujours parfaitement étalonnés, que j'ai eu l'opportunité d'utiliser : pâtes à papier, presse d'impression de laboratoire IGT, coucheuse de laboratoire CLC-7000, microscope stéréoscopique Nikon, raffineur de laboratoire Type Valley, unité pilote de traitement de surface par vario-gravure et par couchage à lame, etc.

Comme quoi, tant au niveau échanges techniques/scientifiques qu'au niveau équipements/installations, la coopération entre un Centre Collégial de Transfert de Technologie (Innofibre) et un centre de recherche universitaire (CRML) constitue un atout essentiel de la réussite de la recherche. J'ose espérer que mon doctorat en est une preuve concrète.

Je remercie tout particulièrement professeur Jean-Claude Roux de Pagora, Institut national polytechnique de Grenoble (INP-Pagora) pour la passion qu'il m'a transmise, notamment du génie papetier ; il a été décisif dans mon choix de carrière internationale.

Mes plus chers remerciements reviennent à mon épouse Chrystelle pour tout son amour, sa générosité et son soutien inconditionnel dans les moments les plus difficiles. Je remercie mes deux petites princesses Lina (8 ans) et Nora (3 ans) pour leur amour et leur énergie débordante. Je remercie tout particulièrement mon petit poupon Adam (1 an). Ton combat pour la vie a été une leçon de foi, d'espoir et de persévérance que nous n'oublierons jamais. Ta naissance a bouleversé notre perception de la vie, à tout jamais. Nous apprécions maintenant chaque seconde que la vie nous offre. Vous m'avez tous apporté énormément de réconfort, de bonheur et de tendresse. Merci.

Je remercie ma chère mère, mon père bien aimé et mon cher « petit » frère. J'espère que cette thèse compensera quelque peu les longues années passées loin de vous. Je suis confiant que Dieu nous donnera l'occasion de rattraper le temps perdu et qu'il transmettra à mes enfants les valeurs de sacrifice et de persévérance.

Je remercie le Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les partenaires industriels du réseau Sentinel pour leur financement.

Mon plus grand souhait est que ce travail contribue au développement et à la commercialisation de papiers bioactifs qui pourront protéger la santé du grand public.

Août 2014

Résumé

Les retombées économiques de commercialisation de papiers bioactifs sont attrayantes. Cependant, le développement de produit peut être coûteux pour une entreprise. L'objectif de cette thèse est de contribuer à répondre aux défis de coût, de qualité et de rapidité de fabrication industrielle de papier bioactif. Pour une fabrication viable de papier bioactif, l'agent bioactif doit pouvoir être produit en grande quantité et de manière économique, tout en résistant aux conditions industrielles de fabrication. L'efficacité de l'agent bioactif à détruire les bactéries présentes sur la surface du papier est une propriété tout aussi exigée. L'agent bioactif doit tolérer les vitesses et les contraintes d'utilisation avec des procédés de fabrication à grande échelle, car la vitesse de préparation en laboratoire de papier bioactif se retrouve dans un autre ordre de grandeur que la vitesse de transfert technologique à l'échelle industrielle. Un autre défi du développement de papier bioactif est celui de la pluridisciplinarité des champs de connaissances qui sont requises, notamment en sciences de la vie, en sciences de la surface et en sciences des matériaux. À l'évidence, le projet de développement de papier bioactif par une entreprise manufacturière peut devenir complexe parce qu'il requiert simultanément, entre autres, la production d'agents bioactifs de qualité et en quantité industrielle, l'élaboration du mode d'interaction entre les agents bioactifs et la surface du papier, et la mise au point de la méthodologie de fabrication en grande quantité de papier bioactif. Cette complexité est intensifiée par le fait que les trois axes de développement de papier bioactif sont au même niveau d'avancement, alors que pour relever idéalement les défis de fabrication de papier bioactif (science des matériaux), des réponses aux défis de fabrication et d'utilisation à grande échelle d'agents bioactifs (sciences de la vie) doivent être adressées, et des solutions aux défis d'immobilisation d'agents bioactifs à la surface du papier (science de la surface) doivent être idéalement développées.

La méthodologie de recherche menée dans ce travail consiste à développer une méthodologie viable de fabrication de papier bioactif (science des matériaux) en considérant les défis cités plus haut. L'analyse et la revue de la littérature sur les aspects liés aux thèmes des sciences de la vie et des sciences de la surface permettent de faire les choix nécessaires pour la réalisation de la méthodologie de recherche, tout en éclairant

sur les paramètres significatifs qui peuvent influencer les résultats. En science de la vie, les aspects revus sont associés aux causes des contaminations alimentaires, aux principales bactéries contaminant l'eau et les aliments, aux agents bioactifs et aux principales méthodes permettant la détection ou la désactivation des bactéries et aux papiers existants pour la lutte contre les contaminations alimentaires. En science de la surface, les interactions potentielles entre les agents bioactifs et le papier sont revues.

Pour réaliser l'objectif de thèse, des choix sont suggérés, puis des hypothèses sont formulées avant d'être vérifiées expérimentalement.

Les choix proposés concernent l'agent pathogène ciblé, l'agent bioactif, la méthode d'immobilisation de ce dernier sur le papier, et la méthode de quantification de l'efficacité des papiers bioactifs. La bactérie *Escherichia coli* B est l'agent pathogène qui a été choisi. Les bactériophages sont les agents bioactifs qui ont été sélectionnés. L'immobilisation physique est la méthode qui a été adoptée pour fixer les phages sur le papier. La quantification de l'efficacité des papiers bioactifs a été réalisée selon une méthode expérimentale qui a été développée à cet effet.

Quatre hypothèses principales ont été formulées avant d'être vérifiées expérimentalement. La première hypothèse est que les enzymes ou les bactériophages sont des biomolécules fragiles qui ne peuvent pas résister aux contraintes de cisaillement rencontrées lors des procédés industriels d'impression et de couchage du papier. La deuxième hypothèse est que les bactériophages sont désactivés lors du séchage du papier bioactif. La troisième hypothèse est que les bactériophages doivent nécessairement être immobilisés sur le papier de manière orientée pour assurer une efficacité suffisante du papier bioactif. La quatrième hypothèse est que les bactériophages doivent nécessairement être immobilisés à la surface du papier et non en profondeur de l'axe d'épaisseur du papier.

La première hypothèse a été confrontée avec un plan expérimental d'étude de l'influence des contraintes de cisaillement typiquement rencontrées lors du procédé d'impression gravure et de couchage à lame. Le plan expérimental consiste à étudier l'influence de la viscosité de la bioencre, puis l'influence des paramètres de vitesse et de pression

d'impression et de couchage. Les enzymes et les bactériophages sont utilisés respectivement comme premier modèle et comme modèle pour le reste de la thèse. Le procédé d'impression gravure est expérimenté en utilisant la presse d'impression de laboratoire IGT pour appliquer une bioencre formulée à base d'enzymes, ainsi qu'une bioencre formulée à base de phages. Le procédé de couchage à lame est expérimenté en utilisant la coucheuse de laboratoire CLC-7000, pour appliquer une sauce de couchage bioactive formulée à base de phages. La mesure de l'efficacité des papiers bioactifs à base d'enzymes est réalisée en utilisant un spectrophotomètre, tandis que la bioactivité des papiers à base de phages est quantifiée en mesurant la zone de lyse (destruction) des bactéries au contact du papier. Les résultats d'étude de l'influence de la viscosité de la bioencre sur la bioactivité des enzymes montrent que les enzymes résistent mieux aux contraintes de cisaillement subies à faibles viscosités, tandis que la bioactivité des enzymes est négativement influencée par les viscosités (Brookfield) supérieures à 100 mPa.s. Les résultats de l'influence de la vitesse d'impression, qui augmente surtout le taux de cisaillement, montrent que les enzymes sont négativement influencées par les vitesses d'impression au-delà de 0,6 m.s⁻¹. Bien que la pression augmente le taux de cisaillement subi par les enzymes, la pression d'impression a un effet global plutôt positif sur la bioactivité des papiers. Les résultats de l'étude de l'influence de la vitesse d'impression sur la bioactivité des phages montrent que les phages ne sont pas affectés par une augmentation du taux de cisaillement associé à l'augmentation de la vitesse d'impression. En revanche, les forces d'impression élevées, au-delà de 300 N, ont un effet dommageable sur la bioactivité des phages, malgré une augmentation du taux de transfert de la bioencre. Lorsque les phages sont appliqués par couchage à lame, les résultats montrent que des vitesses de couchage élevées, allant jusqu'à 600 m.min⁻¹, ne compromettent pas de manière appréciable la bioactivité des phages. Toujours en couchage à lame, l'augmentation des contraintes de cisaillement résultant d'une plus grande viscosité (de 100 à 250 mPa.s) n'est pas nuisible à l'efficacité des phages. Les résultats de couchage à lame de phages montrent aussi que la réduction de la pression de la lame docteur induit une augmentation générale de la bioactivité avec l'augmentation de l'espacement de la lame docteur. Cette augmentation de la bioactivité peut découler soit d'une augmentation du poids de couche (en déposant simplement plus de phages sur le

papier) ou d'une augmentation de la survie des phages au couchage (provenant d'une pression réduite de la lame de couchage). Cependant, l'isolation du facteur de poids de couche en utilisant l'aire spécifique de zone de lyse, montre que ce n'est pas la totalité des phages déposés sur le papier qui participent à la destruction des bactéries.

La deuxième hypothèse selon laquelle les bactériophages seraient désactivés lors du séchage du papier bioactif a été testée avec un plan expérimental qui consiste à quantifier l'effet de l'humidité des papiers bioactifs. Les résultats de test des papiers bioactifs à base de phages fabriqués par impression gravure montrent que l'humidité ambiante influence significativement les résultats de bioactivité des papiers, laquelle se retrouve significativement réduite entre des conditions de stockage des papiers à 90% d'humidité relative et un environnement d'utilisation à 30% d'humidité relative. La bioactivité du papier devient nulle lorsque le taux d'humidité du papier est de 5%. La possibilité pour que les phages deviennent à nouveau bioactifs lorsque les papiers sont remouillés existe, et cela a été examiné. Les résultats montrent que la bioactivité du papier peut être presque complètement réactivée avec le remouillage du papier. Cependant, la baisse de bioactivité semble être plus abrupte avec chaque cycle de séchage/réhumidification. Nous soupçonnons que le mouillage répétitif des papiers bioactifs fait pénétrer les phages à l'intérieur de la structure de fibres et loin de la surface du papier. L'utilisation de gélatine comme agent de rétention d'humidité est la deuxième solution proposée pour pallier contre l'effet dommageable du séchage du papier. Les résultats montrent l'effet bénéfique de l'utilisation de la gélatine sur la durée de conservation de papiers bioactifs fabriqués par couchage à lame. L'ajout de gélatine permet aux phages de résister au séchage infrarouge à haute intensité subi lors du procédé de couchage, et d'atténuer l'effet de décroissance rapide de l'humidité du papier bioactif dans le temps.

La troisième hypothèse selon laquelle les phages doivent nécessairement être immobilisés sur le papier de manière orientée pour assurer une bioactivité suffisante du papier bioactif a été mise à l'épreuve avec un plan expérimental d'étude de l'influence d'une précouche cationique sur la bioactivité de phages immobilisés sur la précouche cationique. L'hypothèse est qu'une précouche cationique permettrait d'immobiliser les phages ayant une charge nette anionique à la surface du papier, tandis que la queue ayant une charge

nette cationique serait librement accessible pour détecter les bactéries qui surviendraient à son contact. Le plan expérimental consiste à imprimer, en premier temps, une précouche cationique à base d'un polyélectrolyte de différentes densités de charge cationique. Les phages sont ensuite appliqués en deuxième couche. À hautes densités de charges cationiques, les résultats montrent que la bioactivité des papiers est plutôt à la baisse au fur et à mesure de l'augmentation de la densité de charges cationique. Cette baisse de bioactivité pourrait être attribuée à l'effet de chevauchement stérique lors des interactions électrostatiques entre le polyélectrolyte et les phages. À faibles densités de charges cationiques, la précouche cationique a un effet plutôt positif sur la bioactivité des phages. Ces résultats montrent que l'orientation des phages sur le papier peut être optimisée, mais cette orientation n'est pas primordiale, car malgré que les phages ne se retrouvent pas tous immobilisés dans une position optimale pour infecter les bactéries, le dépôt d'un grand nombre de phages implique qu'une quantité suffisante de phages se retrouve nécessairement dans la bonne position.

La quatrième hypothèse voulant que les phages doivent nécessairement être immobilisés à la surface du papier et non en profondeur de l'axe d'épaisseur du papier a été vérifiée expérimentalement par l'étude de l'influence de l'emplacement des phages sur l'axe d'épaisseur du papier, en utilisant des papiers ayant différentes porosités. La méthode utilisée est celle de modifier la porosité du papier de base, par le raffinage des fibres qui modifie la distribution de la structure poreuse du papier et la pénétration des phages en profondeur du papier. Les phages sont ensuite immobilisés par impression gravure sur les différents papiers de base. Les résultats montrent qu'une structure de papier ouverte, *i.e.*, une grande porosité de papier, permet une plus grande prise et une plus grande rétention des phages. Cependant, les papiers à structure ouverte produisent des papiers ayant une bioactivité significativement inférieure aux papiers ayant une faible porosité. L'effet est vraisemblablement dû à la tendance des phages à pénétrer dans la masse de la structure des papiers ayant des perméabilités à l'air élevées, alors que les phages vont se concentrer principalement à la surface des papiers ayant une faible perméabilité à l'air. Les résultats montrent clairement que la bioactivité du papier décroît drastiquement avec l'augmentation de la perméabilité à l'air du papier, malgré l'augmentation du taux de transfert des phages. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle une structure de

papier plus fermée, maintient les phages à la surface du papier et le rend plus efficace pour détruire les bactéries pathogènes.

Mots Clés

Papier bioactif, contaminations alimentaires, bactériophages, enzymes, emballage alimentaire, essais bioactifs, résistance des biomolécules, gélatine, conservation, structure du papier, humidité du papier, conditions industrielles, couchage, impression.

Table des Matières

Avant-propos.....	iii
Remerciements.....	iv
Résumé.....	vii
Table des Matières	xiii
Liste des Figures	xviii
Liste des Tableaux	xxi
Liste des Équations	xxii
Liste des Abréviations.....	xxiii
Chapitre 1 - Introduction.....	24
1.1 Problématique de la contamination alimentaire	24
1.2 Objectifs du réseau Sentinel	28
1.3 Objectif du travail de thèse.....	30
Chapitre 2 - Revue bibliographique.....	32
2.1 Lutte contre les contaminations alimentaires	32
2.2 Identification des agents pathogènes de contaminations alimentaires	32
2.2.1 Identification des virus de contamination alimentaire.....	32
2.2.2 Identification des bactéries de contamination alimentaire	33
2.2.3 Facteurs de survie des bactéries d'origine alimentaire.....	40
2.3 Identification des agents bioactifs contre les contaminations alimentaires.....	44
2.3.1 Anticorps	45
2.3.2 Aptamères.....	47
2.3.3 Enzymes	50

2.3.4	Bactériophages	55
2.4	Méthodes d'immobilisation d'agents bioactifs à la surface du papier	60
2.4.1	Immobilisation physique d'agents bioactifs.....	62
2.4.2	Immobilisation chimique d'agents bioactifs	65
2.5	Méthodes de lutte contre les contaminations alimentaires	67
2.5.1	Méthodes de contrôle d'agents pathogènes alimentaires	67
2.5.2	Méthodes de détection d'agents pathogènes alimentaires.....	68
2.6	Papiers pour la lutte contre les contaminations alimentaires.....	75
2.6.1	Papiers antimicrobiens pour le contrôle d'agents pathogènes.....	76
2.6.2	Papiers pour la détection d'agents pathogènes.....	78
Chapitre 3 - Méthodologie de la recherche.....		80
3.1	Matériels	80
3.1.1	Pâte à papier	80
3.1.2	Papiers	81
3.1.3	Enzyme peroxydase de raifort.....	87
3.1.4	ABTS	87
3.1.5	Carboxyméthylcellulose.....	87
3.1.6	Bactériophage T4.....	88
3.1.7	Escherichia Coli	88
3.1.8	PolyDADMAC.....	88
3.1.9	Gélatine.....	89
3.2	Équipements	90
3.2.1	Presse d'impression de laboratoire IGT	92
3.2.2	Spectrophotomètre Technidyne Colour Touch PC.....	93
3.2.3	Microscope stéréoscopique Nikon SMZ800	93

3.2.4	Adobe Photoshop CS3.....	94
3.2.5	Équipements microbiologiques	94
3.2.6	Coucheuse de laboratoire CLC-7000	94
3.2.7	Raffineur de laboratoire Type Valley	95
3.2.8	Formette dynamique.....	96
3.3	Méthodes	97
3.3.1	Formulation d'une bioencre à base d'enzymes	97
3.3.2	Formulation d'une bioencre à base de phages.....	98
3.3.3	Impression gravure d'enzymes et de phages.....	98
3.3.4	Formulation d'une sauce de couchage à base de phages.....	100
3.3.5	Couchage à lame de phages.....	100
3.3.6	Isolation et de concentration de phages.....	102
3.3.7	Propagation des phages	103
3.3.8	Énumération des lysats de phages	105
3.3.9	Impression d'une précouche cationique	105
3.3.10	Imprégnation de couche bioactive.....	106
3.3.11	Conditionnement des papiers bioactifs à base de phages.....	107
3.3.12	Pulvérisation contrôlée des phages.....	107
	Chapitre 4 - Plan expérimental	108
4.1	Phase 1 - Développement d'une méthode d'immobilisation d'enzymes à la surface du papier.....	109
4.1.1	Étape 1 – Définition des paramètres de fabrication des papiers par impression.....	110
4.1.2	Étape 2 – Optimisation du taux de transfert de l'encre sur le papier	111

4.1.3	Étape 3 – Formulation et impression d’une bio-encre sur le papier	111
4.1.4	Étape 4 – Quantification de la bioactivité des papiers bioactifs à base d’enzymes	112
4.1.5	Étape 5 – Étude de la résistance des enzymes aux contraintes d’impression : viscosité de la bioencre.....	113
4.1.6	Étape 6 – Étude de la résistance des enzymes aux contraintes d’impression : vitesse et pression d’impression	114
4.1.7	Étape 7 – Étude du temps de stockage de la bioencre.....	114
4.1.8	Étape 8 – Étude des conditions de stockage des papiers bioactifs à base d’enzymes	115
4.2	Phase 2 : Développement d’une méthode de fabrication de papier bioactif à base de phages pour le contrôle de bactéries.....	116
4.2.1	Étape 1 – Formulation d’une bioencre à base de phages et l’imprimer sur papier.....	118
4.2.2	Étape 2 – Développement d’une méthode de quantification de l’activité d’un papier bioactif à base de phages.....	118
4.2.3	Étape 3 – Estimation de la résistance des phages aux contraintes de cisaillement en impression héliogravure.....	118
4.2.4	Étape 4 – Étude de la résistance des phages aux contraintes d’impression gravure : vitesse et pression.....	119
4.2.5	Étape 5 – Étude de la résistance des phages aux contraintes de couchage à lame: vitesse et pression	119
4.2.6	Étape 6 – Étude de l’influence de l’humidité sur l’efficacité des papiers bioactifs	120
4.2.7	Étape 7 – Étude de l’influence de la nature d’immobilisation des phages : utilisation d’une précouche cationique	121
4.2.8	Étape 8 – Étude de l’influence de l’emplacement des phages sur l’efficacité des papiers bioactifs : porosité du papier	123
	Chapitre 5 - Résultats et analyses	125
5.1	Fabrication de papier bioactif à base d’enzymes.....	125

5.2	Quantification de la bioactivité d'un papier bioactif à base de phages	132
5.3	Estimation de la résistance mécanique des agents bioactifs.....	140
5.4	Résistance des phages aux contraintes d'impression gravure	142
5.5	Influence de l'humidité du papier bioactif à base de phages.....	146
5.6	Résistance des phages aux contraintes de couchage	151
5.7	Discussion de l'influence de la gélatine sur l'efficacité des papiers bioactifs	155
5.8	Influence d'une précouche cationique sur la bioactivité des papiers	161
5.9	Influence de la porosité du papier sur l'efficacité des papiers bioactifs.....	167
Chapitre 6 - Conclusions.....		170
6.1	Conclusions générales	170
6.2	Travaux futurs.....	176
Publications reliées à la thèse		181
Bibliographie.....		183
Annexe 1 : Protocole de fabrication de papiers par formette dynamique.....		203
Annexe 2 : Méthode d'énumération des lysats de phages		205
Annexe 3 : Méthode d'isolation de la bactérie hôte		210
Annexe 4 : Méthode d'énumération de la bactérie hôte		211
Annexe 5 : Énumération de phages en simple couche d'agar		212
Annexe 6 : Mesure de la force d'immobilisation des phages sur le papier		214

Liste des Figures

Figure 2-1 Déterminants virulents des bactéries pathogènes.....	34
Figure 2-2 Causes des contaminations alimentaires au Québec en 2010-2011	35
Figure 2-3 Structure d'une molécule d'anticorps	45
Figure 2-4 Exemple de la spécificité des aptamères	49
Figure 2-5 Structure du bactériophage T4 [69].....	59
Figure 3-1 Pâte NBSK R ₀ non raffinée.....	80
Figure 3-2 Pâte NBSK R ₁ raffinée 15 min – CSF 620 mL	84
Figure 3-3 Pâte NBSK R ₂ raffinée 30 min – CSF 550 mL	85
Figure 3-4 Pâte NBSK R ₃ raffinée 45 min – CSF 500 mL	85
Figure 3-5 Pâte NBSK R ₄ raffinée 60 min – CSF 450 mL	86
Figure 3-6 Acide 2,2'-Azino-bis 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (ABTS)	87
Figure 3-7 Poly(diallyl-diméthyl-ammonium-chloride).....	89
Figure 3-8 Point de gélification et viscosité des sauces de couchage bioactives.....	89
Figure 3-9 IGT Global Standard Tester 2	92
Figure 3-10 Coucheuse de Laboratoire CLC-7000.....	95
Figure 3-11 Raffineur de laboratoire Type Valley	95
Figure 3-12 Formette dynamique.....	97
Figure 3-13 Représentation schématique de l'impression gravure	99
Figure 4-1 Phase 1: Fabrication de papier bioactif à base d'enzymes	109

Figure 4-2 Méthode d'utilisation des papiers bioactifs à base d'enzyme HRP	112
Figure 4-3 Papier bioactif à base d'enzyme HRP	113
Figure 4-4 Plan factoriel d'influence de la vitesse et de la pression d'impression.....	114
Figure 4-5 Phase 2: Fabrication de papier bioactif à base de phages	117
Figure 4-6 Représentation schématique des phages sur la surface du papier	122
Figure 5-1 Réponse colorimétrique des papiers bioactifs selon le papier de base.....	125
Figure 5-2 Effet de la viscosité d'encre sur la bioactivité du papier	127
Figure 5-3 Effet de la vitesse de transfert sur la bioactivité du papier	128
Figure 5-4 Effet de la pression d'impression sur la bioactivité du papier.....	129
Figure 5-5 Réponse colorimétrique de la bioencre après révélation.....	130
Figure 5-6 Influence des conditions de stockage pré-utilisation des papiers bioactifs...	131
Figure 5-7 Profil tridimensionnel de surface du cylindre d'impression utilisé	143
Figure 5-8 Caractérisation du transfert d'encre selon la vitesse d'impression.....	144
Figure 5-9 Caractérisation du transfert d'encre selon la force d'impression	144
Figure 5-10 Résultats de la quantification de la bioactivité des phages imprimés	144
Figure 5-11 Influence de la vitesse d'impression sur la bioactivité des papiers.....	145
Figure 5-12 Influence de la force d'impression sur la bioactivité des papiers	146
Figure 5-13 Effet significatif de l'humidité sur l'efficacité des papiers bioactifs	147
Figure 5-14 Influence du temps de séchage sur la bioactivité des phages sur papier.....	148
Figure 5-15 Réactivation des papiers bioactifs après leur remouillage	148

Figure 5-16 Influence de la réhumidification du papier sur l'activité des phages.....	149
Figure 5-17 Influence de la pression de la lame de couchage sur la bioactivité.....	151
Figure 5-18 Influence de la viscosité et du grammage sur la bioactivité spécifique	152
Figure 5-19 Influence de la vitesse de couchage sur la bioactivité des papiers.....	153
Figure 5-20 Influence de la viscosité et du grammage sur la bioactivité spécifique	154
Figure 5-21 Décroissance de la bioactivité en fonction du temps	155
Figure 5-22 Déposition de goutte de phages mélangés à de la gélatine de type A.....	157
Figure 5-23 Déposition de goutte de phages mélangés à de la gélatine de type B.....	157
Figure 5-24 Bioactivité de phages sur précouche à haute densité de charge cationique	162
Figure 5-25 Bioactivité des phages immobilisés sur précouche hautement cationique..	164
Figure 5-26 Bioactivité des phages immobilisés sur précouche légèrement cationique	165
Figure 5-27 Caractéristiques de transfert d'encre des papiers R0 à R5	167
Figure 5-28 Bioactivité des papiers en fonction du nombre de phages déposés	168
Figure 5-29 Influence de la perméabilité à l'air du papier sur la bioactivité.....	169
Figure A-6-1 Presse et séchoir de laboratoire.....	204

Liste des Tableaux

Tableau 3-1 Propriétés physiques et optiques du papier non couché en feuilles.....	81
Tableau 3-2 Propriétés physiques et optiques du papier couché LWC en feuilles.....	82
Tableau 3-3 Propriétés physiques et optiques du papier non couché au sulfite.....	83
Tableau 3-4 Propriétés physiques du papier non couché en rouleau	83
Tableau 3-5 Propriétés physiques des papiers non couchés à porosité contrôlée.....	86

Liste des Équations

Équation 1: Calcul de la différence entre deux couleurs	93
Équation 2: Tenseur des contraintes de cisaillement	140
Équation 3: Force exercée sur une biomolécule	141
Équation 4: Force exercée par une pression à la surface d'une biomolécule	141
Équation 5: Force nécessaire à étirer un polymère par une distance r	142
Équation 6: Temps de relaxation d'une chaîne de polymère idéale	142
Équation 7: Aire spécifique de la zone de lyse	145
Équation 8: Énumération de phages à partir de dilutions de 100 μl de phages	209
Équation 9 : Énumération de bactéries à partir d'une dilution de bactéries	211
Équation 10 : Énumération de phages à partir de dilutions de 50 μl de phages	213
Équation 11 : Énumération de phages à partir d'une dilution de phages.....	215

Liste des Abréviations

ABTS	Acide 2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique
ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine Triphosphate
CBD	Cellulose Binding Domain
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIC	Centre International de Couchage
CIE	Commission Internationale de l'éclairage
CLC	Cylindrical Laboratory Coater
CMC	Carboxyméthylcellulose
CRIFS	Centre de Recherche Canadien de Sécurité Alimentaire
CRSNG	Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada
CSF	Canadian Standard Freeness
DGSAIA	Direction générale de la santé animale et de l'inspection des aliments
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
HRP	Horseradish Peroxidase
IGT	Institute for the Graphic Techniques
ISO	Organisation internationale de normalisation
IMS	Immuno Magnetic Separation
LPS	Lipopolysaccharides
LWC	Papier couché léger ou Light Weight Coated
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
MOI	Multiplicity Of Infection
NBSK	Pâte kraft blanchie de résineux du nord
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAPTAC	Pulp and Paper Technical Association of Canada
PCR	Polymerase Chain Reaction
PolyDADMAC	Poly-diallyl-diméthyl-ammonium-chloride
PPS	Parker Print Surf
QCM	Quartz Crystal Microbalance
SELEX	Selective Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SM	Sens marche d'une toile de formation
ST	Sens travers d'une toile de formation
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
TMP	Thermo-Mechanical pulp
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unité formant une colonie
UFP	Unité formant une plage
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Problématique de la contamination alimentaire

Les maladies d'origine alimentaire sont contractées à la suite de l'ingestion de nourriture contaminée par des agents pathogènes tels que des bactéries, virus, parasites ou prions. Elles constituent une menace grandissante de santé publique à travers le monde, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Les symptômes de contamination alimentaire sont nombreux : fièvre, frissons, maux de tête, crampes abdominales, diarrhées accompagnées parfois de sang, nausées, vomissements, fatigue, faiblesses et étourdissements, perte d'appétit, perte de poids, ballonnements, gaz, jaunisse, douleurs musculaires.

Les données statistiques de contamination alimentaires recueillies, ainsi que les résultats des enquêtes menées sur les toxi-infections alimentaires, sont utiles, mais d'intérêt parfois limité. En effet, la surveillance et la vigie des éclosions ne permettent pas d'anticiper les scénarios de contaminations potentielles dans le futur, ce qui constitue un défi supplémentaire de la problématique des contaminations alimentaires. Les enquêtes permettent néanmoins de spécifier les besoins de solutions, d'identifier les principaux agents pathogènes concernés, les principaux aliments touchés et les autres paramètres potentiellement significatifs lors du développement d'une solution contre les contaminations alimentaires.

Les contaminations alimentaires sont en constante augmentation à travers le monde. Chaque année, 1 à 2 milliards de personnes sont infectées par des bactéries, et 70% de ces infections sont d'origine alimentaire [1]. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), une personne sur trois est victime d'une maladie d'origine alimentaire chaque année dans les pays industrialisés. Aux États-Unis d'Amérique, les infections alimentaires causent 76 millions de maladies, 325 000 hospitalisations et 5 000 morts chaque année [2]. Au Canada, les experts de la santé publique estiment à environ 11 à 13 millions le nombre de Canadiens souffrant annuellement de maladies d'origine alimentaire, représentant plus de 40% de la population.

Au Québec, la direction générale de la santé animale et de l'inspection des aliments (DGSAIA), qui est placée sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), est le maître d'œuvre des interventions d'inspection dans les établissements alimentaires du Québec. Les bilans annuels du MAPAQ font état de 3565, 3117 et 3445 personnes malades entre le 1^{er} avril et le 31 mars 2008-2009, 2009-2010 et 2010-2011 respectivement. Au Québec, les services d'inspection des aliments ont reçu 31,5% plus de signalements en 2008-2009 que la moyenne des 5 années précédentes, soit 2003-2008. Le nombre signalé des personnes malades a également augmenté de 11,3% en 2008-2009 par rapport aux 5 années précédentes. Dans notre région, en Mauricie, le nombre de contaminations alimentaires signalées ont été de 40, 33 et 65 cas par 100 000 habitants en 2008-2009, 2009-2010 et 2010-2011 respectivement [3-5].

Les contaminations alimentaires engendrent également des coûts financiers importants qui n'ont été analysés et quantifiés que depuis peu. L'incidence financière globale des contaminations alimentaires est difficile à estimer. En 2006, les coûts pour les États-Unis seulement ont été estimés entre 6,5 et 35 milliards de dollars U.S [6], tandis qu'une récente étude estime le coût économique des contaminations alimentaires en 2012 à 77 milliards de dollars U.S annuellement [7], en baisse par rapport aux estimations précédentes de 152 milliards de dollars U.S annuellement évaluées en 2010 par le CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Ces estimations concernent uniquement les coûts médicaux, les pertes de productivité et les mortalités associées aux maladies, sans compter le coût des rappels, des litiges et la perte de la confiance des consommateurs. Au Canada, les experts médicaux estiment le coût des contaminations alimentaires à 1,3 milliard annuellement en perte de productivité et dépenses médicales. Au Québec, les coûts associés uniquement à l'inspection et aux analyses de laboratoire se sont élevés en 2008-2009 à 2,8 millions de dollars et 1,5 million de dollars, respectivement, pour un total de près de 4,3 millions de dollars [4]. En outre, la littérature rapporte que le nombre de signalements faits annuellement par les organismes de surveillance représente moins de 5 % de la réalité; les coûts sont donc probablement très supérieurs à ces valeurs.

En définitive, les contaminations alimentaires créent un besoin grandissant d'amélioration de la salubrité des aliments. Toujours au Québec, plusieurs aliments mis en cause dans les enquêtes alimentaires étaient des produits prêts-à-manger. Le groupe alimentaire « viandes et volailles » a été le plus souvent visé par les déclarations de toxi-infections alimentaires (37,4%). Les groupes « Lait et produits laitiers » et « Fruits et légumes » ont engendré une augmentation importante des toxi-infections en 2009-2010 et 2010-2011 respectivement.

L'estimation des principaux agents pathogènes associés aux contaminations alimentaires est à la fois difficile et très utile pour l'allocation de ressources et la priorisation des interventions. En 2007, l'OMS a lancé une initiative pour estimer l'impact global des maladies alimentaires [8]. Cependant, les principaux agents pathogènes responsables de contaminations alimentaires au niveau mondial n'ont pas été identifiés.

Aux États-Unis, les cinq principaux agents pathogènes associés à des contaminations alimentaires ayant causé près de 56 000 hospitalisations en 2011 sont *Salmonella nontyphoidal* (35%), norovirus (26%), *Campylobacter spp.* (15%), *Toxoplasma gondii* (8%) et *E.coli* O157:H7 (4%). Les cinq principaux agents pathogènes associés à des contaminations alimentaires ayant causé 1351 morts en 2011 sont *Salmonella nontyphoidal* (28%), *Toxoplasma gondii* (24%), *Listeria monocytogenes* (19%), *Norovirus* (11%) et *Campylobacter spp.* (6%). 64% des hospitalisations et des morts associées aux maladies alimentaires ont été causées par des bactéries.

Au Québec, les agents pathogènes qui ont été le plus souvent à l'origine des signalements sont les salmonelles, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter*. Au Québec, la majorité (93 %) des toxi-infections alimentaires confirmées ou probables est d'origine microbiologique (non virale).

À l'occasion des visites d'inspection relatives aux toxi-infections alimentaires, les lacunes qualifiées de « très graves » se rapportaient aux facteurs suivants, en ordre décroissant d'importance : la température des aliments, l'introduction d'agents pathogènes, la survie d'agents pathogènes, l'innocuité des produits, le lavage des mains, l'état ou la nature du matériel, le refroidissement, l'environnement, les animaux,

la propreté du matériel, l'état de santé des manipulateurs d'aliments, l'origine des produits et l'étiquetage, les enregistrements et l'eau chaude disponible dans l'établissement [4, 5].

Au cours des trois dernières années, le MAPAQ et l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) ont diffusé de nombreux communiqués de presse de rappels d'aliments qui faisaient état, par exemple, de la présence de staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) représentant un risque pour la santé dans des pâtes à lasagne fraîches (juin 2008); la présence possible de salmonelles dans des fromages frais (août/septembre 2008); la présence de *Listeria monocytogenes* dans divers fromages (août, septembre et octobre 2008), dans de la tête fromagée (octobre 2008), de la poitrine de bœuf fumée (novembre 2008) et dans autres produits de charcuterie (août 2008); la présence d'*Escherichia coli* (*E. coli*) dans des mets préparés (août 2009) et présence potentielle d'*E. coli* O157:H7 dans des noix de Grenoble (avril 2011).

Au Canada, le traitement des animaux d'élevage avec des antibiotiques est un moyen pour prévenir les maladies bactériennes des animaux et augmenter la productivité de l'élevage. Non seulement cette solution appliquée aux animaux ne protège pas le consommateur des contaminations lors des étapes de transformation de l'aliment, mais les nombreux antibiotiques injectés aux animaux quotidiennement tels qu'amoxicilline, tétracycline, érythromycine et ceftiofur occasionnent une résistance des bactéries pathogènes aux traitements antibiotiques administrés aux patients canadiens contaminés par la consommation de l'aliment [9].

Le meilleur moyen pour réduire l'impact des toxi-infections alimentaires est la prévention. En octobre 2009, des communiqués préventifs de la DGSAIA (Direction générale de la santé animale et de l'inspection des aliments) visaient à rappeler les règles d'hygiène et de salubrité à suivre lors de la cuisson et de la manipulation des volailles. En mai 2009, le ministre de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec a lancé la campagne annuelle de prévention de la maladie du hamburger. Au printemps 2009, le gouvernement du Québec a adopté une loi visant la régularisation et le développement d'abattoirs de proximité afin de se donner les moyens d'augmenter la fréquence des inspections dans ces établissements.

En avril 2010, un communiqué traitant de la préparation sécuritaire des têtes-de-violon (crosses de fougères) a été publié. En août 2010, des communiqués sur la manipulation des aliments en général, sur la conservation des aliments et sur des astuces de conservation pour la boîte à lunch ont été publiés. En décembre 2010, un communiqué sur la prévention des toxi-infections alimentaires pendant le Temps des Fêtes a été publié. Pendant toute l'année, les grandes chaînes d'alimentation du Québec informent la population québécoise sur le mode de cuisson adéquat des viandes hachées et attendries en apposant entre autres des étiquettes de sensibilisation sur leur emballage, comme mesure de prévention contre les toxi-infections à *E.coli* O157 :H7.

Considérant l'absence d'un moyen à grande échelle de prévention contre les contaminations alimentaires, ce travail de thèse vise à étudier la faisabilité et la viabilité d'une utilisation généralisée d'un moyen de réduction à grande échelle des toxi-infections alimentaires. En complément aux étiquettes apposées sur les emballages des aliments en guise de sensibilisation des consommateurs, nous suggérons l'adoption d'un emballage dit « bioactif », car celui-ci permettrait de détruire le plus grand nombre des bactéries pathogènes potentiellement présentes au contact de l'emballage afin de le réduire en dessous du seuil critique pour la santé des personnes.

1.2 Objectifs du réseau Sentinel

Dans le cadre du réseau stratégique pancanadien Sentinel du Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG), un papier bioactif est défini comme étant un papier pouvant détecter, capturer et/ou désactiver des agents pathogènes présents dans l'air, l'eau et les aliments. Créer un papier bioactif est un concept innovant de lutte contre les contaminations alimentaires imaginé par professeur Robert Pelton de l'Université McMaster. Afin d'évaluer si le papier bioactif n'est qu'un rêve de chercheur ou s'il existe un véritable potentiel de développement de nouvelles solutions de lutte contre les contaminations alimentaires, de l'eau et de l'air, le réseau Sentinel a été créé en octobre 2005 et renouvelé pour une phase deux en 2010.

L'originalité du concept réside dans l'exploitation des qualités du papier qui, outre des propriétés physiques uniques telles que flexibilité, porosité, recyclabilité etc., offre la possibilité de fabrication en grande quantité et à faible coût.

Les retombées positives du développement de papier bioactif sont nombreuses. Les partenaires du réseau Sentinel pourront utiliser les résultats des travaux de recherche pour créer des papiers bioactifs exclusifs ; emballages alimentaires diagnostiques, masques et vêtements de protection pour les travailleurs de la santé, filtres à air et à eau, etc. Les scientifiques et les ingénieurs canadiens formés dans le cadre des travaux réalisés par le réseau Sentinel auront des compétences uniques en génie des matériaux et en sciences biologiques. Ils pourront ainsi aider l'industrie canadienne des pâtes et papiers à devenir un fournisseur de produits de pointe et à grande valeur ajoutée. Les papiers bioactifs seront également très utiles dans les pays en développement qui ont un besoin criant pour des tests simples et peu coûteux pour détecter les maladies.

Au cours de la première période entre 2005 et 2010, le réseau Sentinel a rassemblé 29 chercheurs universitaires répartis dans 11 universités travaillant en partenariat avec 8 partenaires industriels, ainsi que 3 partenaires gouvernementaux. La recherche menée dans le cadre du réseau Sentinel est organisée en trois thèmes : le thème des sciences de la vie, le thème des sciences de la surface et le thème des sciences des matériaux.

Ce travail de thèse se positionne dans le cadre du thème sciences des matériaux qui a pour objectif de démontrer la faisabilité de fabrication à grande échelle, *i.e.* à grande vitesse, et à moindre coût de papiers bioactifs efficaces au moyen de procédés d'impression et de couchage conventionnels. Des collaborations ont également eu lieu avec d'autres chercheurs du thème des sciences de la vie qui œuvrent au développement d'agents bioactifs ainsi qu'avec les chercheurs du thème des sciences de surface qui étudient spécifiquement les interactions entre les agents bioactifs et le papier.

Suite à cette première période, le réseau Sentinel est devenu le chef de file mondial reconnu de l'innovation dans le domaine des papiers bioactifs [10, 11].

Grâce aux résultats des travaux de recherche, l'intérêt de l'industrie pour les produits qui permettraient de tester la sûreté des aliments et de l'eau ainsi qu'aux fonds supplémentaires attribués par le CRSNG pour la période 2010-2015, le présent travail de recherche a pu continuer à contribuer au progrès dans le domaine des papiers bioactifs dans le cadre d'une plateforme de recherche technologique axée sur la commercialisation de papiers bioactifs à base de bactériophages.

1.3 Objectif du travail de thèse

L'objectif général de la thèse est de démontrer la faisabilité de la fabrication industrielle d'un emballage bioactif pour le contrôle de bactéries, par l'étude en laboratoire des principaux paramètres de fabrication de papiers bioactifs.

D'un point de vue commercial, le papier bioactif devra pouvoir être fabriqué de manière efficace et peu coûteuse; *i.e.* que le coût additionnel de fabrication n'ampute pas la rentabilité économique du papier d'emballage. Ceci peut être réalisé en utilisant des procédés de fabrication conventionnels et, si possible, déjà existants dans les usines papetières.

Considérant que le développement d'un papier bioactif d'emballage revient à concevoir un nouveau produit papier innovant et que ce processus fait intervenir plusieurs champs scientifiques pluridisciplinaires, notre étude de littérature a été basée sur les principes de processus d'innovation afin de sélectionner les paramètres d'étude les plus significatifs qui sont impliqués dans la conception d'une solution commerciale viable à grande échelle, et ce, compte tenu des différentes contraintes de succès commercial d'un tel produit.

À ce stade, il est important de définir plus précisément le processus d'innovation qui doit être entrepris pour établir les bases de la connaissance dans le domaine des papiers bioactifs. Selon Roger Miller, ex-titulaire de la chaire de recherche Jarislowsky en gestion de l'innovation de l'École Polytechnique de Montréal, l'acceptation du produit par le marché est le test ultime de l'innovation.

Si le papier bioactif devient un succès commercial, alors le papier bioactif sera une innovation, c'est-à-dire une nouveauté qui répond à un besoin réel et qui surpasse tout autre produit similaire existant sur le marché. Sans résultat économique, il n'y a pas d'innovation; il n'y a que de belles idées voire de belles inventions qui ne répondent pas aux besoins, qui arrivent trop tôt ou trop tard. Selon Roger Miller, la grande découverte, le nouveau produit, ne correspond qu'à environ 5% de l'économie, alors que 95% reposent sur l'amélioration continue de procédés et de produits. Le processus d'innovation proposé dans l'objectif du travail de thèse vise le succès commercial du papier bioactif.

La première étape de notre processus d'innovation est de cibler et identifier un besoin réel : la lutte contre les contaminations alimentaires est le besoin qui a été identifié et développé précédemment en introduction à la section 1.1. La deuxième étape est de faire la revue des méthodes existantes de contrôle des agents pathogènes responsables des contaminations alimentaires. Finalement, la troisième étape est d'identifier les méthodes déjà existantes à base de papier et ayant des fonctionnalités bioactives, avant de synthétiser les forces et les faiblesses de ses produits concurrentiels. Cette étape permettra de justifier le choix du papier bioactif à développer, donc de préciser l'objectif de la thèse en ciblant le papier bioactif présentant le meilleur intérêt.

Chapitre 2 - Revue bibliographique

2.1 Lutte contre les contaminations alimentaires

La lutte contre les contaminations alimentaires implique la détection ou le contrôle d'agents pathogènes en utilisant des agents bioactifs dans le cadre d'une méthode de détection ou de contrôle avec ou sans support papier.

2.2 Identification des agents pathogènes de contaminations alimentaires

Les agents pathogènes regroupent tous les microorganismes pathogènes viables : bactéries, virus, parasites et champignons. Il est important de définir les principaux agents pathogènes responsables de contaminations alimentaires. Cependant, selon la littérature, 80% des contaminations alimentaires sont causées par des agents pathogènes non identifiés. Au Québec par exemple, seulement 36,5% des agents pathogènes ont pu être identifiés en moyenne au cours des trois dernières années 2009-2011 [3-5], correspondant à 464 identifications sur 1376 en moyenne par année. Ce constat constitue un premier défi lors du développement d'un moyen de lutte spécifique contre les agents pathogènes de contamination alimentaire.

Selon l'Agence canadienne d'inspection des aliments, les 10 plus importants agents pathogènes alimentaires identifiés au Canada sont les bactéries *E. coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter jejuni* et *Clostridium botulinum*, les virus Norovirus et Hépatite A, et le parasite *Cyclospora*.

2.2.1 Identification des virus de contamination alimentaire

Plusieurs contaminations alimentaires sont causées par la consommation d'aliments contaminés par des virus. Au Québec, en juin 2008, lors d'une enquête alimentaire sur une éclosion virale liée à la consommation de salades, des restes de salades de pommes de terre ont été récupérés pour expertises virales et la présence de rotavirus a été décelée [4].

En janvier 2011, une éclosion suprarégionale d'infections à norovirus a touché 300 personnes ayant consommé différents aliments dans des buffets froids préparés par un traiteur de la région de Laval. Les personnes ont présenté des symptômes de gastroentérite compatibles avec une infection virale, mais les recherches virales n'ont pas démontré la présence de l'agent suspecté [3].

En effet, la présence des virus responsables de contaminations alimentaires est souvent difficile à démontrer soit parce que leur concentration est très faible, soit parce qu'il n'existe aucune méthode analytique pour l'alimentation. La méthode la plus exacte pour confirmer la présence de virus est la culture virale. Au Québec, le MAPAQ a mis au point des analyses de polymérisation en chaîne afin d'aider à l'identification de la présence de rotavirus ou de norovirus dans les aliments. En fonction même de la difficulté de détection, donc de mesure de l'activité bioactive, le type de papier bioactif que nous développerons ne sera pas de type antiviral.

2.2.2 Identification des bactéries de contamination alimentaire

La nomenclature des bactéries est régie par le Code international de la nomenclature bactérienne [12] qui reconnaît des groupes taxonomiques tels que classe, sous-classe, ordre, sous-ordre, famille, tribu, genre, sous-genre, espèce et sous-espèce. Bien que le code ne donne volontairement aucune directive concernant la typographie, qui relève du domaine éditorial, il est préférable d'écrire les noms scientifiques de bactéries en italique pour rappeler leur origine latine [13]. Les noms des classes et des sous-classes prennent une majuscule et sont formés par l'ajout du suffixe *-ia* (classe) ou *-idae* (sous-classe). Le nom des espèces est formé d'une combinaison binaire dont le premier terme est le nom de genre (*Escherichia*) qui prend une majuscule tandis que l'épithète désigne l'espèce et commence par une minuscule (*coli*). Les espèces sont subdivisées en biotypes, sérotypes, lysotypes et pathotypes. Les biotypes désignent un ensemble de caractères qui appartiennent à la même espèce de bactéries. Les sérotypes d'une espèce sont désignés par leurs formules antigéniques (par exemple *E.coli* O157:H7) [14]. Les lysotypes sont déterminés en fonction de la sensibilité des bactéries à divers types de bactériophages. Les pathotypes sont des regroupements de bactéries en fonction de leur capacité à être à l'origine de la même maladie.

Pour les applications de développement de biocapteurs pour la détection de bactéries, l'identification de la partie la plus externe de la bactérie est importante. Une bactérie ayant une membrane extérieure est dite Gram-négative, alors qu'une bactérie n'ayant pas de membrane extérieure est dite Gram-positive.

Les antigènes font partie des déterminants virulents des bactéries pathogènes (Figure 2-1) [15] qui sont capables de déclencher chez l'homme une réaction immunitaire caractérisée par la production d'anticorps. Toutes les méthodes immunologiques de détection de bactéries se basent sur la détection de ces antigènes.

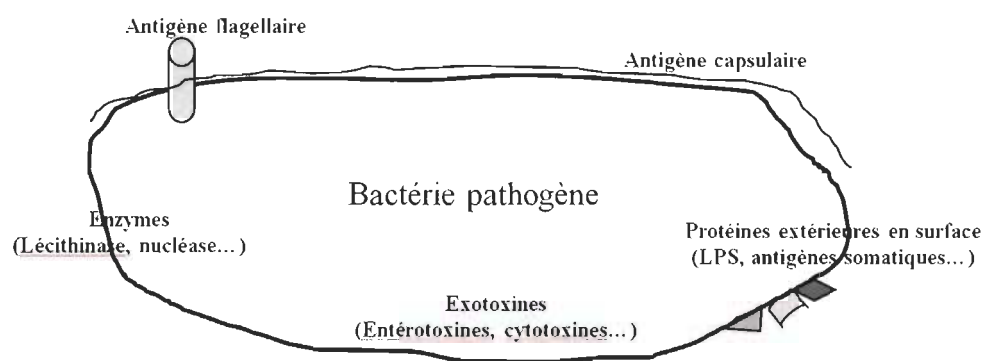


Figure 2-1 Déterminants virulents des bactéries pathogènes

Les bactéries sont généralement bénéfiques, non pathogènes et sont omniprésentes chez les humains, les animaux et les plantes. Cependant, certaines bactéries sont nuisibles et pathogènes, pouvant causer des maladies à l'homme. Par exemple, l'espèce *E.coli* qui comprend des souches bénéfiques pour le système digestif humain est associée aux contaminations alimentaires impliquant les souches pathogènes *E.coli* O157:H7 ou *E.coli* O104:H4.

Au Québec, au cours des trois dernières années, les principales bactéries responsables de contaminations alimentaires ont été *Salmonella*, *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter* [3-5]. La Figure 2-2 illustre les causes des 455 cas de contaminations alimentaires d'origine microbiologique confirmés par un diagnostic médical et un isolement de la souche dans les aliments, parmi le grand total de 1366 cas de toxi-infections alimentaires déclarés au Québec en 2010-2011.

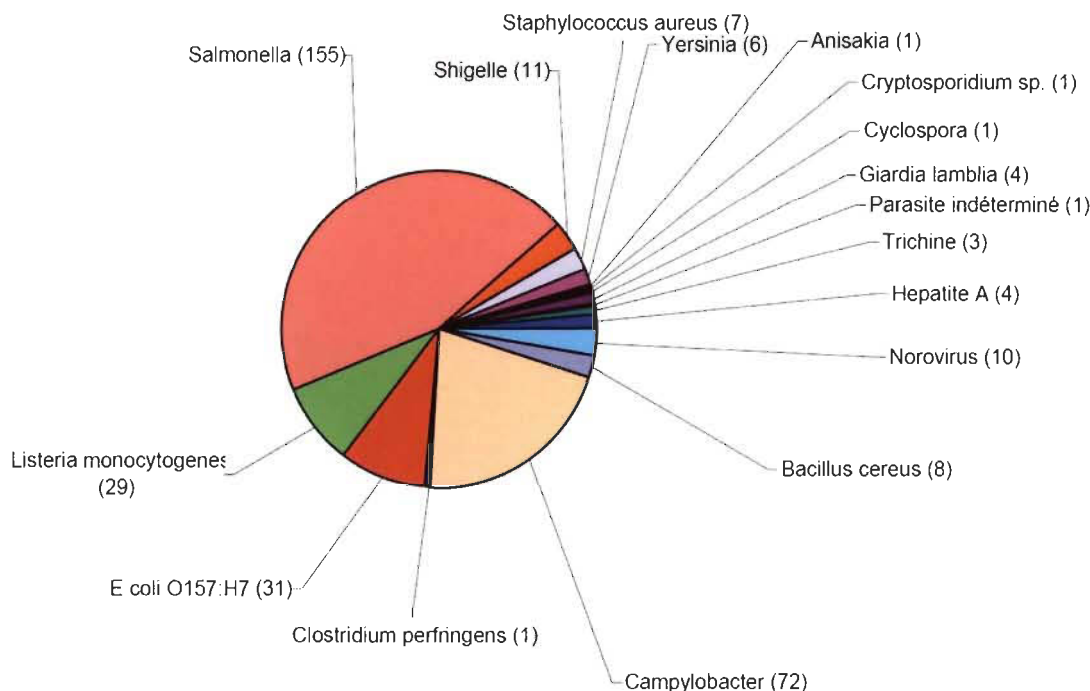


Figure 2-2 Causes des contaminations alimentaires au Québec en 2010-2011

Par conséquent, les trois principales bactéries pathogènes qui seront revues sont *Salmonella*, *Listeria* et *E.coli* O157:H7.

2.2.2.1 *Salmonella*

La bactérie *Salmonella*, à Gram négative, a été découverte par le scientifique américain Salmon en 1885. L'ingestion d'aliments contaminés par *Salmonella* résulte en la salmonellose, une maladie dont les symptômes vont de gastro-entérites à des fièvres typhoïdes¹. Dans les cas les plus sévères, *Salmonella* peut migrer dans le sang ou dans le système lymphatique² et résulter en bactériémie³ ou évoluer en septicémie [16]. Il n'existe aucun vaccin contre la salmonellose, et d'après l'OMS, le nombre de patients atteints de salmonellose dans le monde serait compris entre 16 et 33 millions de personnes, avec plus de 200 000 décès annuellement [17].

¹ Caractérisée par des lésions intestinales, une fièvre cyclique et des troubles nerveux et intestinaux.

² Système de vaisseaux qui drainent la lymphe à l'intérieur des nœuds lymphoïdes du corps.

³ Présence de bactéries qui sont détectées dans le sang circulant.

La majorité (90%) des cas de salmonellose est causée par la consommation d'un aliment contaminé, principalement de la viande, des produits laitiers et des œufs [18]. Les aliments contaminés peuvent être particulièrement frais et avoir une apparence et une odeur tout à fait normales. La saison d'été est plus propice à la salmonellose, à cause des risques de contaminations dues à la rupture de la chaîne de froid. Seule la cuisson peut avoir raison de *Salmonella*, d'où les risques liés à la consommation d'aliments crus, et l'intérêt d'utiliser un papier bioactif au contact des viandes prêtes à la consommation.

Au Québec, le poulet a été à l'origine de 33% des salmonelloses en 2009, et 50% des cas en 2011. Les signalements de salmonelloses au Québec ont été de 226 en 2009, en augmentation importante par rapport à 2007 (71 signalements) et 2008 (73 signalements). Le nombre de signalements est ensuite resté très important et s'est élevé à 203 en 2010 et 187 en 2011.

En août 2008, une éclosion suprarégionale de salmonellose causée par *Salmonella enteritidis* pulsovar⁴ 3 lysotype⁵ 13 a touché 141 personnes, principalement dans 4 régions du Québec, dont 12 cas en Mauricie. Les enquêtes épidémiologiques ont révélé que la cause la plus probable de la maladie était la consommation d'un fromage pasteurisé (en grains ou en bloc) vendu dans différents commerces de détail du Québec. Le lot de fromage aurait été contaminé par un employé saisonnier porteur de salmonelles. D'importants rappels avaient été annoncés par le MAPAQ en août et septembre 2008.

De mai à octobre 2009, 89 cas de *Salmonella enteritidis* pulsovar 31 lysotype 13A ont été recensés dans 6 provinces canadiennes, soit l'Alberta et Terre-Neuve (1 cas chacun), l'Ontario et le Nouveau-Brunswick (2 cas chacun), la Saskatchewan (3 cas), la Colombie-Britannique (21 cas) et le Québec (59 cas). Les cas québécois résidaient dans 16 régions administratives du Québec. Selon les enquêtes épidémiologiques, la cause la plus probable de la maladie est la consommation de poulet et d'œufs, principalement au domicile [5].

⁴ Le pulsovar est ce qui permet d'identifier l'empreinte génétique d'une bactérie. Il est obtenu à partir d'un test appelé « électrophorèse sur gel en champ pulsé ».

⁵ Subdivision d'espèces bactériennes en fonction de leur réaction à des bactériophages.

De mai à septembre 2010, une éclosion nationale d'infections à *Salmonella Hartford* (SH) pulsovar 11 d'origine indéterminée a été signalée au MAPAQ touchant 8 personnes résidant dans six régions du Québec et cinq autres cas dans d'autres provinces canadiennes. En juillet 2010, 10 personnes ont été touchées par une éclosion régionale d'infections à *Salmonella typhimurium* (ST) pulsovar 7 lysotype 150 associées à la consommation de rouleaux printaniers dans un restaurant vietnamien de Laval et dont la cause la plus probable serait que l'étape de nettoyage et d'assainissement a été mal effectuée, principalement sur la surface de travail qui recevait le poulet cru où l'on préparait les rouleaux printaniers.

2.2.2.2 Listeria

La bactérie *Listeria*, à Gram-positive, a été découverte par Murray et Pirie en 1927. *Listeria* est responsable de la listériose, une sévère maladie bactérienne qui peut causer une infection du système nerveux central, une septicémie ou un avortement. La maladie est mortelle dans 20 à 30% des cas, et le temps d'incubation est long [19]. Le risque de listériose augmente avec le changement des habitudes de consommation (réduction du temps de préparation des aliments, aliments prêts à consommer et prêts à emporter). De plus, les nouvelles méthodes agroalimentaires de production d'aliments à longue durée de conservation augmentent le temps de multiplication de la bactérie [19]. Listéria est retrouvée fréquemment dans les aliments crus ou non traités tel que les viandes, légumes, produits laitiers et charcuteries prêts à la consommation. Même réfrigérée à 4°C, la bactérie tend à se multiplier dans les aliments contaminés.

Au Québec, la majorité des aliments suspectés en 2009 ne nécessitaient pas que le consommateur les manipule pour les faire cuire ou les préparer. Il s'agissait principalement de fromages (57 %) et de charcuteries (12 %). En 2011, les aliments concernés étaient très diversifiés et 20,7% des signalements concernait des charcuteries.

Chaque année, au Canada, entre 100 et 140 cas de listériose sont déclarés. En 2008, 57 cas associés à l'éclosion de Listériose ont été déclarés au Canada, dont 22 morts [20]. En 2009, 76 signalements de listérioses ont été transmis au Québec seulement; une augmentation importante des signalements comparativement à l'année 2008, où le

MAPAQ n'en avait reçu que seize. Par la suite, les signalements de listérioses au Québec ont baissé à 26 en 2010 et à 29 en 2011.

En Mauricie, dans une boucherie de Shawinigan, *Listeria monocytogenes* P180 a été décelée en septembre 2008 dans de la tête fromagée fabriquée avec du porc haché. L'incident avait causé la fermeture temporaire de l'établissement pour éliminer l'agent pathogène.

Entre la fin juillet et la fin décembre 2008, une éclosion suprarégionale de 41 cas de listériose due à *Listeria monocytogenes* P93 a sévi au Québec. Les enquêtes épidémiologiques, les enquêtes alimentaires et la caractérisation génique des souches humaines, alimentaires et environnementales ont permis de déterminer que deux marques différentes de fromages pasteurisés provenant d'une même usine de fabrication ont été à l'origine de cette éclosion. Ces fromages ont été contaminés après leur pasteurisation, à la suite notamment des multiples manipulations d'affinage. Vendus dans les commerces de détail du Québec, ils ont entraîné la contamination de plusieurs autres fromages québécois ou importés. Il est cependant important de souligner les difficultés de détections rencontrées lors des échantillonnages : sur un total de 732 échantillons de fromages et 32 produits entrant dans la fabrication des fromages, et suite à 1393 essais environnementaux et 179 prélèvements environnementaux à la ferme, la présence de *Listeria monocytogenes* n'a été détectée que dans moins de 13 % des fromages échantillonnés et 3 % des surfaces où l'on avait procédé à un prélèvement.

À l'automne 2010 et début de l'hiver 2011, l'éclosion nationale d'infections à *Listeria monocytogenes* pulsovar 222 a touché 4 personnes au Québec et 1 personne en Ontario, impliquant un établissement montréalais et la consommation d'aliments prêts-à-manger [3], mais les enquêtes n'ont pas permis de trouver un véhicule alimentaire qui aurait contaminé l'établissement.

Les éclosions pèsent lourd sur l'économie du Québec. En 2008-2009, les enquêtes épidémiologiques ou alimentaires visaient 79 établissements alimentaires, dont 94 % appartenaient au secteur tertiaire (détaillants, fromageries ou restaurants). Parmi ces établissements, 40,5 % ont dû, soit arrêter de vendre leurs produits, soit fermer

partiellement (rayon des fromages) ou encore fermer complètement, avant de tous reprendre leurs activités normales après l'éclosion.

2.2.2.3 *Escherichia coli* O157:H7

La bactérie *Escherichia coli*, à Gram-négative, découverte en 1885 par Theodor Escherich est une bactérie entérique, hôte normal de la microflore digestive⁶ de l'homme et d'animaux [21]. La présence d'*E.coli* dans un aliment indique une contamination fécale.

La découverte de la souche O157:H7 remonte à 1982 où deux épidémies de colite⁷ hémorragique sévère apparurent aux États-Unis après consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Les analyses des selles des patients et de la viande de bœuf congelée mirent en évidence une souche *E.coli* ayant le sérotype⁸ O157:H7 : ce code correspond à l'identification au phénotype⁹ particulier des protéines de surface de la bactérie. Ainsi le «O» (de l'allemand *ohne* *Hauch* = sans pellicule) correspond à l'antigène somatique et le «H» (de l'allemand *Hauch* = pellicule) correspond à l'antigène flagellaire.

L'effet néfaste d'*E.coli* O157:H7 sur la santé est dû à la production par la bactérie d'une grande quantité de vérotoxines¹⁰ qui causent des colites hémorragiques et des insuffisances rénales parfois mortelles, surtout chez les enfants de moins de 5 ans [21].

Au Québec, 86 signalements relatifs à *E.coli* O157:H7 ont été reçus en 2009, 56 signalements en 2010 et 31 signalements en 2011. Environ 80% des signalements étaient liés à des aliments consommés à la maison dont 90 % provenaient d'un détaillant. En 2009, 59% des enquêtes ont porté sur des produits de viande et 37% sur des produits laitiers, dont 31 % étaient des fromages de lait cru. En 2010, 80% des aliments concernés était des produits de viande, 14% des aliments divers, 2% de l'eau, 2% du lait cru et 2% des charcuteries. En 2011, les aliments concernés étaient également des

⁶ Écosystème complexe peuplé de milliers d'espèces bactériennes différentes, ayant des fonctions bénéfiques pour l'homme.

⁷ Inflammation aiguë ou chronique du côlon.

⁸ Subdivision à l'intérieur d'une espèce de microorganismes, établie en fonction des propriétés antigéniques de la bactérie.

⁹ Ensemble des caractères morphologiques ou fonctionnels définissant visiblement une espèce.

¹⁰ Toxine qui détruit certaines cellules des reins et de l'intestin.

produits de viande (68%), des aliments divers (16%), des noix de Grenoble (10%) et du lait cru ou du fromage de lait cru fabriqué sans autorisation de transformation de produits laitiers (6%).

Entre octobre 2008 et janvier 2009, l'éclosion d'*E.coli* O157:H7 pulsovar 849 a touché 14 personnes au Québec et a été associée à la consommation d'un fromage à pâte molle affiné qui a été fabriqué dans une usine non titulaire d'un permis de transformation des produits laitiers. Entre avril 2009 et avril 2010, aucune éclosion majeure d'*E.coli* O157:H7 n'a été rapportée au Québec. En 2011, l'éclosion nationale d'infection à *E.coli* O157:H7 pulsovar 608 associée à la consommation de noix de Grenoble a sévi du début mars à la fin avril 2011, touchant 14 personnes (10 au Québec, 2 en Ontario et 2 au Nouveau-Brunswick) [3].

2.2.3 Facteurs de survie des bactéries d'origine alimentaire

Lors de l'utilisation commerciale finale du papier bioactif, les agents bioactifs présents sur le papier devront résister aux contraintes environnementales des aliments sur lesquels les papiers seront utilisés. Les études se rapportant à la résistance des bactéries pathogènes toxi-alimentaires aux contraintes environnementales des aliments sont nombreuses. Cependant, notre revue critique de la littérature à cet égard est originale, car l'utilisation efficace d'un papier bioactif en contact alimentaire nécessite avant tout que les agents bioactifs qu'il contient soient efficaces aux mêmes contraintes environnementales des bactéries pathogènes hôtes. Non seulement l'agent bioactif devra résister aux contraintes alimentaires des bactéries, mais sa bioactivité devra idéalement être optimale pour contrecarrer la dynamique de prolifération des bactéries sur l'aliment. Ultimement, l'étude des contraintes environnementales des agents bioactifs permet de définir les aliments ciblés par l'emballage bioactif.

Les contraintes environnementales qui seront analysées dans la revue bibliographique sont la température, la teneur en sel, l'acidité et l'effet des conservateurs alimentaires. Cependant, dans notre contexte de fabrication de papier, les contraintes environnementales d'utilisation du papier bioactif ont été maintenues constantes lors des expérimentations au laboratoire.

La température d'utilisation du papier bioactif a été fixée à 37°C afin de fournir les conditions de croissance optimales des bactéries *E.coli* à contrôler. Le pH a été maintenu à 7. La teneur en sel a été établie à 0,9% pour fournir l'équilibre osmotique adéquat pour la croissance des bactéries. Aucun agent de conservation alimentaire n'est ajouté au milieu de croissance des bactéries.

Néanmoins, l'humidité d'utilisation du papier bioactif a fait l'objet d'une étude à la section 5.5 pour la contribution originale des résultats obtenus à l'avancement des connaissances dans le domaine de développement de papiers bioactifs.

Aux étapes de validation de l'efficacité du papier bioactif directement sur des aliments, nous suggérons de compléter la démarche de raisonnement en examinant, l'effet de la température des aliments, l'effet de la teneur en sel des aliments, l'effet de l'acidité de l'aliment, l'effet des conservateurs alimentaires et l'effet des différentes matrices alimentaires potentielles sur l'efficacité des papiers bioactifs à utiliser. Dans le cas d'utilisation d'un cocktail de phages contre une ou plusieurs bactéries, il est également suggéré de s'assurer de la résistance spécifique des agents bioactifs aux conditions de prolifération de leurs bactéries hôtes. Ces travaux sont cependant hors contexte de notre objectif de thèse.

La souche non pathogène *E.coli* B sera utilisée dans ce travail en tant que modèle pour la bactérie pathogène *E.coli* O157:H7, en raison des contraintes de niveau de sécurité [22] dans nos laboratoires, en nous assurant que les résultats de la recherche puissent être appliqués à des bactéries pathogènes. La bactérie pathogène *E.coli* O157:H7 est revue car la très faible dose infectieuse et la difficulté relative pour détruire la bactérie rend celle-ci remarquablement dangereuse.

2.2.3.1 Contraintes de thermorésistance d'*E.coli* O157:H7

Le taux de croissance d'*E.coli* O157:H7 augmente avec l'augmentation de la température, avec une croissance optimale à 37°C et une température maximale de croissance de 45°C [23].

Au-delà de 45°C, *E.coli* O157:H7 arrête de se développer en bouillon de culture. La thermorésistance de la bactérie dépend de la matrice alimentaire (avec une plus grande résistance dans de la viande hachée que dans du poulet [24]) et de la composition de l'aliment [25]. À 65°C, dans de la viande hachée, la bactérie est désactivée en 9 secondes [23]. La bactérie est plus résistante dans des steaks hachés de «basse qualité», contenant 30% d'autres ingrédients, que dans des steaks de «haute qualité» contenant 100% de viande de bœuf.

À très basse température, *E.coli* O157:H7 peut survivre jusqu'à -80°C dans de la viande hachée de bœuf, et résiste pendant 9 mois de stockage à -20°C [23]. À températures de réfrigération, *E.coli* O157:H7 peut se développer au laboratoire jusqu'à 7°C [26], à 8°C dans du cidre de pommes et à 12°C dans de la salade [27].

Par conséquent, la bioactivité de l'agent bioactif à utiliser dans le cas d'*E.coli* O157:H7 devrait idéalement être préservée même aux températures de réfrigération et de conservation de l'aliment (7°C et moins). Il est également primordial que l'agent bioactif soit efficace jusqu'à une température de 45°C et plus, au cas où la chaîne de froid serait accidentellement rompue à ce niveau critique de température. À toute fin pratique, les mesures de prévention et d'inactivation d'*E.coli* O157:H7 recommandées sont d'atteindre une température de 72°C au cœur des produits cuits et de 74°C pour le réchauffage de ces mêmes produits cuits.

Il serait également pertinent de cibler les viandes de basse qualité dans l'utilisation de papier bioactif, mais considérant l'importance du prix dans le choix de ce produit de grande consommation, l'amélioration de la sécurité du consommateur devra transiger avec un coût additionnel au plus bas du papier bioactif.

2.2.3.2 Contraintes de résistance d'*E.coli* O157:H7 à l'acidité

La bactérie *E.coli* O157:H7 résiste à l'acidité [28], mieux que la bactérie *Salmonella* dont les caractéristiques physiologiques (croissance, survie, mort) sont proches. Un pH 3,8 n'a pas empêché des infections alimentaires de yaourts au lait cru [29] et de mayonnaise [30].

Par conséquent et idéalement, l'agent bioactif à utiliser contre *E.coli* O157:H7 devra non seulement résister à pH 4, mais se montrer aussi efficace en milieu acide pour freiner la prolifération d'*E.coli* O157:H7 dans les conditions qu'elle tolère.

2.2.3.3 Contraintes de résistance d'*E.coli* O157:H7 à la teneur en sel

Les sels contribuent au maintien d'un milieu osmotique¹¹ favorable pour les cellules et évite leur déshydratation, mais les sels ont aussi une action bactériostatique¹² à partir d'une concentration typique de 10 %.

La bactérie *E.coli* O157:H7 réussit à se développer dans des solutions de NaCl à des concentrations supérieures à 2,5% et parfois jusqu'à 6,5%. Mais à des concentrations de sel supérieures à 8,5%, la croissance de la bactérie est inhibée [31, 32]. En général, la concentration en sel dans les aliments est de l'ordre de 4 %, ce qui astreint à conserver les aliments au froid.

Par conséquent, le choix de l'agent bioactif à utiliser contre *E.coli* O157:H7 devrait être idéalement efficace en milieu ayant une concentration en sel jusqu'à 10%.

2.2.3.4 Contraintes de résistance d'*E.coli* O157:H7 aux conservateurs alimentaires

Certains conservateurs, comme le sorbate¹³ et le benzoate¹⁴ limitent la multiplication d'*E.coli* O157:H7 [33] dépendamment de l'acidité de l'aliment, sa teneur en sel et sa température de stockage [34]. Par exemple, la présence de nitrites dans le cas des produits de salaison de viandes désactive *E.coli* O157:H7 [35].

Par conséquent, lorsque certains conservateurs alimentaires bactéricides sont utilisés dans un aliment, le papier bioactif pourrait ne pas apporter de valeur ajoutée pour protéger le consommateur.

¹¹ Relatif à l'osmose. L'osmose signifie « poussée » et désigner la force qui tend à équilibrer les concentrations moléculaires.

¹² Qui arrête la multiplication des bactéries sans les détruire.

¹³ Agent conservateur retrouvé dans les yaourts aux fruits, les sauces et les boissons.

¹⁴ Agent conservateur utilisé pour une large gamme de produits acides ou légèrement acides.

2.3 Identification des agents bioactifs contre les contaminations alimentaires

La lutte contre les contaminations alimentaires et le besoin grandissant de produire des aliments de qualité dépendent de plus en plus d'agents antimicrobiens naturels pouvant inhiber les microorganismes responsables de la détérioration des aliments, les agents pathogènes de contamination alimentaire et les toxines. Les produits chimiques synthétiques, les agents antimicrobiens non naturels ou génétiquement modifiés ne feront pas l'objet d'une revue de littérature, car ceux-ci sont difficilement applicables en contact alimentaire et sont ici considérés hors contexte.

Les agents antimicrobiens naturels peuvent être dérivés de sources microbiennes (bactériophages, bactéries, algues, champignons), de produits dérivés d'animaux (protéines laitières, chitosane, amines biogènes) ou de plantes (huiles essentielles, phytochimique, composés bioactifs)[36].

Les agents bioactifs qui sont revus dans ce travail sont les principaux agents bioactifs, dérivés de sources microbiennes, permettant de désactiver des bactéries pathogènes : les anticorps et les bactériophages. Les aptamères et les enzymes sont également revus, car ils peuvent intervenir dans la détection de bactéries pathogènes.

Les bactériophages sont sensibles, spécifiques et peu dispendieux, mais la détection de leur bioactivité est lente. Les anticorps sont spécifiques, rapides, mais dispendieux et relativement peu sensibles. Les aptamères sont spécifiques et résistants tout en étant plus sensibles et moins dispendieux que les anticorps. Les enzymes sont spécifiques et rapides, mais dispendieux et ne peuvent pas directement désactiver des bactéries.

L'étude de la littérature sur les agents bioactifs porte particulièrement sur leurs interactions avec les agents pathogènes hôtes. L'analyse des mécanismes de bioactivité permet de faire ressortir les contraintes et les paramètres qui influencent significativement l'efficacité du papier bioactif développé.

Les principaux critères de choix d'agents bioactifs sont la viabilité d'une production économique en grande quantité, et le potentiel d'approbation pour utilisation en contact alimentaire par des organismes de réglementation tels que *L'Agence canadienne d'inspection des aliments* pour commercialisation au Canada ou l'organisme *Food and Drug Administration* pour commercialisation aux États-Unis. Nous utiliserons donc des agents bioactifs biologiques et non chimiques. Les agents bioactifs génétiquement modifiés ou non naturels peuvent difficilement être homologués. Les bactériophages et les enzymes seront choisis et utilisés. Les anticorps et aptamères ne seront pas utilisés.

2.3.1 Anticorps

Les anticorps - à la forme de la lettre Y (Figure 2-3, [37]) - sont des agents bioactifs fabriqués par le système immunitaire pour se défendre contre des antigènes étrangers ou des agents pathogènes.

Les anticorps sont des glycoprotéines, des protéines résultant de l'union covalente d'une fraction glucidique avec une fraction protéinique. Les anticorps possèdent une région d'extrême variabilité associée à une région constante, ce qui en fait des protéines particulièrement complexes. Comme toutes les protéines, les anticorps sont formés de plus de 100 acides aminés [38]. Les acides aminés qui composent les protéines, mis à part leur amine primaire et leur fonction acide en position alpha, n'ont potentiellement qu'une autre fonction soit acide, soit basique.

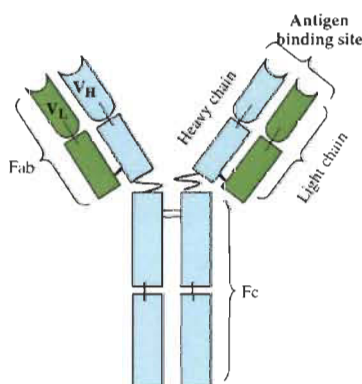


Figure 2-3 Structure d'une molécule d'anticorps

L'interaction et la liaison entre un anticorps et son antigène cible se situent au niveau de la partie bioactive de l'anticorps : le fragment F_{ab} situé aux deux bras du Y (Figure 2-3) et constitué de deux paires identiques de chaînes polypeptides¹⁵ (une chaîne légère V_L et une chaîne lourde V_H) liées par des liaisons disulfure¹⁶. Les interactions entre anticorps et antigènes sont à la base de toutes les méthodes moléculaires immunologiques pour la détection de bactéries pathogènes.

Dans le cadre du développement d'un papier bioactif à base d'anticorps, l'immobilisation de l'anticorps doit idéalement être réalisée au niveau du fragment F_c situé à la queue du Y (Figure 2-3) qui est constitué d'une paire de chaînes polypeptides lourdes [37]. Les anticorps les plus souvent utilisés sont les anticorps A et G. L'immunoglobuline G (IgG) est proprement orientée et active lorsqu'elle est immobilisée sur son fragment F_c qui n'a pas d'affinité avec un antigène. Ainsi, le fragment actif $F(ab')_2$ s'attache librement avec les antigènes ciblés [39]. Le papier devra donc comprendre des récepteurs du fragment F_c . L'orientation jouera également un important rôle dans la réussite d'immobilisation d'anticorps, la sensibilité du test et la capacité de l'anticorps à s'attacher à l'antigène [39], comme cela a été démontré par certains travaux [40-42]. L'orientation appropriée des anticorps donne une capacité d'attache de 42 à 48%, alors que cette capacité est de 18 à 22% lorsque l'orientation des anticorps est aléatoire [41]. Mais, ces résultats ne prennent pas en considération l'influence du procédé de transfert des anticorps. Les contraintes d'immobilisation d'anticorps à la surface du papier dépendent également de la nature de l'immobilisation choisie (revues à la section 2.4). L'évaluation de la résistance des anticorps aux contraintes de transfert à grande échelle contribuerait significativement au processus de développement de papier bioactif à base d'anticorps.

En analyse alimentaire, lorsque le système de détection nécessite un événement de reconnaissance biomoléculaire, les méthodes de détection à base d'anticorps sont considérées le standard, car elles sont bien établies et permettent d'atteindre la sensibilité et la sélectivité désirée, en fonction de la qualité des anticorps.

¹⁵ Polymère formé d'environ 100 acides aminés au maximum. Au-delà, on parle de protéine.

¹⁶ Lien covalent fort qui s'accomplit spontanément en condition oxydante (présence de dioxygène).

Les anticorps monoclonaux¹⁷ sont des anticorps de grande qualité qui peuvent détecter spécifiquement une bactérie ou ses toxines [37]. Les anticorps polyclonaux¹⁸ sont de moindre coût, peuvent être tout aussi spécifiques que les anticorps monoclonaux, et sont utilisés dans la plupart des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), l'agglutination et la capture immunomagnétique (section 2.5.2.2). Il a été reporté [43] que l'efficacité des réactions de détection de bactéries à base d'anticorps sont significativement réduites lorsque les bactéries sont exposées à un stress environnemental. Dans le développement de papier bioactif à base d'anticorps pour la détection de bactéries, l'influence des stress environnementaux sur les réactions de détection doivent d'abord être examinés car les activités physiologiques des cellules sont souvent altérées en réponse à un stress.

Si des anticorps sont envisagés dans une méthode de détection multi-analyte ou pour l'analyse d'échantillons très complexes, des limitations liées à la nature et à la synthèse des anticorps peuvent survenir. C'est pour contourner ces inconvénients que les aptamères peuvent être considérés comme molécules de bio-reconnaissance alternatives.

Comme rappel, l'objectif de notre thèse est de démontrer la faisabilité de la fabrication industrielle d'un emballage bioactif pour le contrôle de bactéries. Puisque les anticorps sont uniquement efficaces pour la détection de bactéries et que leurs coûts de production ne favorisent pas leur utilisation à grande échelle, les anticorps ne seront pas expérimentés dans cette thèse.

2.3.2 Aptamères

Aptamère est un néologisme formé sur le latin *aptus* (apte, approprié à, ou qui se lie à) et le suffixe mère (unité de base composant un polymère) pour désigner un polymère adapté à une fonction [44]. Un aptamère est un oligonucléotide, c'est-à-dire un fragment d'acide nucléique (ADN et ARN), une macromolécule constituée d'un enchaînement linéaire de nucléotides monophosphatés.

¹⁷ Anticorps ne pouvant reconnaître qu'un seul antigène.

¹⁸ Mélange d'anticorps de différentes classes pouvant reconnaître plusieurs antigènes.

Les nucléotides sont nommés par leur base azotée : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T), la cytosine (C) et l'uracile (U) (Figure 2-4, a).

Dans le domaine médical, les systèmes de diagnostic multi-paramètres doivent permettre de détecter des biomarqueurs de maladies, présents en quantités infimes et très contaminés par les composants non spécifiques du sang ou des liquides organiques. Dans le domaine de la détection de contamination alimentaire, lors du développement de systèmes analytiques pour la mesure rapide et multi-analyte d'échantillons complexes, l'utilisation d'aptamères devient très pertinente [45].

Les aptamères sont des agents bioactifs très sensibles et très spécifiques pour la détection efficace de biomarqueurs. La principale raison d'utiliser des acides nucléiques en bio-reconnaissance est le fait qu'ils peuvent être synthétisés, amplifiés et modifiés de façon rapide, économique et efficace [46]. La synthèse chimique d'oligonucléotides est devenue une pratique standard et économique : 200 nmol de nucléotides d'ADN (2.10^{16} molécules) se vendent 100 \$ et sont reçues en quelques jours [46]. Les premiers aptamères ont été nommés comme tel en 1990 par Ellington *et al.* [47] avec l'invention de la technique appelée SELEX (évolution sélective de ligands¹⁹ par enrichissement exponentiel) [48] qui consiste à sélectionner un aptamère ayant une activité souhaitée à partir de cycles successifs de synthèse aléatoire d'oligonucléotides, de sélection et d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR. La méthode PCR permet de copier un milliard de fois, un acide nucléique connu, par des cycles d'appariement²⁰ d'oligonucléotides spécifiques et d'élongation à l'aide d'une enzyme polymérase²¹.

Les aptamères ont une capacité extraordinaire de distinguer entre deux molécules due à leur extraordinaire diversité structurale tridimensionnelle, malgré le manque de diversité chimique d'acide ribonucléique (ARN) et d'acide désoxyribonucléique (ADN) [46]. L'aptamère théophylline (Figure 2-4, a), par exemple, est capable de distinguer entre son ligand théophylline²² et la molécule caféine (Figure 2-4, b) qui ne diffère que d'un seul

¹⁹ Molécule capable de se fixer à une biomolécule et de déclencher un effet biologique.

²⁰ Liaison des nucléotides, 2 à 2, par des ponts hydrogènes entre deux régions de molécules d'acide nucléique.

²¹ Enzyme catalysant une polymérisation des nucléotides, dans la formation d'acides nucléiques.

²² Principale substance active des feuilles de thé et qui est retrouvée également dans le café et le guaraná.

groupe méthyle²³ (Figure 2-4, [46]), grâce à l'adoption dynamique d'une structure incluant le ligand cible dans l'aptamère [49].

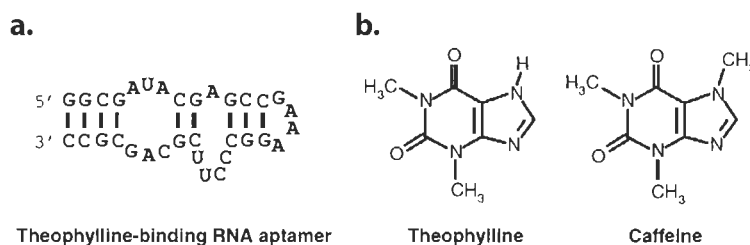


Figure 2-4 Exemple de la spécificité des aptamères

La compréhension des interactions entre les aptamères et leurs ligands est importante pour le développement d'un papier bioactif à base d'aptamères. Bien que les molécules d'ARN et d'ADN aient une diversité chimique limitée, les aptamères ont de remarquables propriétés d'interactions [46]. Contrairement à la plupart des protéines qui ont des poches de liaison prépliées qui nécessitent un réarrangement structural minimal lors de l'interaction avec le ligand, un aptamère non lié est dans un état peu structuré et c'est lors de son interaction avec sa molécule cible qu'il adopte une architecture plus complexe dans laquelle le ligand joue une part importante. C'est précisément cette stratégie d'interaction des aptamères, appelée reconnaissance adaptative, qui permet aux acides nucléiques d'améliorer leur capacité à reconnaître beaucoup de cibles potentielles [46]. Une autre particularité de l'interaction de l'aptamère avec son ligand, contrairement aux protéines, est que l'aptamère compte davantage sur les interactions d'empilement (stacking) que sur les liaisons hydrogène intermoléculaires. En plus des interactions d'empilement impliquant les chaînes latérales des acides aminés aromatiques, les interactions entre les aptamères et leurs ligands impliquent également des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et de complémentarité de forme.

Rares sont les travaux de détection de bactéries pathogènes qui ont porté sur les bactéries de contamination alimentaires. L'intérêt d'utiliser des aptamères pour la détection de bactéries pathogènes est actuellement ciblé sur la détection des agents

²³ Radical alkyle hydrophobe dérivé du méthane (CH₄) par la perte d'un atome d'hydrogène.

potentiellement utilisés comme armes biologiques, tel que *Bacillus anthracis* (bactérie responsable de l'anthrax), *Yersinia pestis* (bactérie responsable de la peste) et *Francisella tularensis* (bactérie responsable de la tularémie) [46].

Les aptamères ont les mêmes avantages que les anticorps en ce qui concerne la sensibilité et la vitesse de détection, mais offrent une meilleure stabilité et un moindre coût de fabrication grâce à une méthode de synthèse d'aptamères renouvelables et plus fiables [46].

Dans le cadre de la fabrication de papier bioactif pour la détection de bactéries pathogènes, des premiers travaux de développement de méthodes de détection de bactéries à base d'aptamères ont été réalisés, dont ceux menés au sein du réseau Sentinel par l'équipe de Yingfu Li de l'Université McMaster [50, 51]. Cependant, les aptamères sont des agents bioactifs encore émergents, dispendieux, peu disponibles, et qui ne conviennent pas aux contraintes de fabrication industrielle, *i.e.* en grandes quantités, de papier bioactif.

L'évaluation des limitations des aptamères à résister aux contraintes de transfert sur papier est d'un grand intérêt scientifique et technologique. Le transfert à grande échelle d'aptamères sur le papier reste cependant un terrain encore inexploité. Les méthodes de détection d'agents pathogènes à base d'aptamères n'en sont qu'à leur balbutiement et ne sont pas suffisamment avancées pour étudier leur mise à l'échelle industrielle.

2.3.3 Enzymes

Les trois principaux atouts des enzymes comme agents bioactifs pour le développement de papier bioactif sont leur coût, leur rapidité de réaction et leur spécificité d'interaction avec leur substrat, au produit et au type de la réaction catalysée [52]. Les enzymes peuvent être relativement peu dispendieuses pour une utilisation industrielle [52], les réactions enzymatiques sont un million de fois plus rapides que des réactions non catalysées et près de 4000 réactions biochimiques peuvent être catalysées par des enzymes [53].

Dans le domaine des biocapteurs, l'électrode enzymatique est considérée comme le tout premier biocapteur ampérométrique, développé à base de l'enzyme glucose oxydase, pour permettre de mesurer une concentration de glucose, en couplant l'enzyme à une électrode à oxygène ampérométrique [54].

Bien qu'ils n'interagissent pas directement avec des agents pathogènes pour les détecter ou les détruire, les enzymes sont des agents bioactifs qui peuvent catalyser une réaction chimique de détection [55] en réduisant l'énergie d'activation²⁴ de la réaction, sans toutefois être consommées par la réaction.

Les enzymes sont des protéines qui reconnaissent spécifiquement leurs substrats avant de catalyser leur transformation. La compréhension de la nature des interactions entre les enzymes et leur substrat, et de l'activité catalytique des enzymes sont clés pour la compréhension des effets d'un transfert à grande vitesse d'enzymes sur le papier. La nature des interactions entre les enzymes et leurs substrats dépend de chaque enzyme. La spécificité de l'activité catalytique des enzymes est expliquée par les formes des molécules d'enzymes : les structures et le site de liaison du substrat sont complémentaires à celles de l'enzyme, au niveau du site de liaison de l'enzyme où l'interaction enzyme/substrat a lieu. L'activité catalytique des enzymes dépend de l'intégrité de la conformation de la protéine native de l'enzyme : les structures primaires, secondaires, tertiaires et parfois quaternaires des enzymes sont essentielles à leur activité catalytique. De plus, certaines enzymes nécessitent un cofacteur qui peut être soit un ion métallique, soit une molécule organique complexe appelée coenzyme, afin que l'enzyme soit complètement active.

La nature des réactions catalytiques des enzymes permet de dégager les facteurs significatifs qui peuvent empêcher ou limiter l'efficacité de l'immobilisation des enzymes sur le papier et ainsi la fabrication à grande échelle de papiers bioactifs à base d'enzymes. La revue de la littérature rapporte que l'activité des enzymes peut être affectée par des molécules inhibitrices, par la température, le pH et la concentration du

²⁴ Quantité d'énergie nécessaire pour initier une réaction, exprimée en kJ.mol^{-1} (kilojoules par mole de réactif).

substrat²⁵. Les molécules inhibitrices peuvent avoir des structures identiques à celles des molécules de substrats, se lier au site actif des enzymes et restreindre ainsi la formation du lien enzyme/substrat. Les molécules inhibitrices peuvent également interagir avec le site actif de l'enzyme, modifier sa forme, empêchant la liaison entre l'enzyme et le substrat. Les changements de température et de pH perturbent les liens intra- et intermoléculaires qui maintiennent les protéines dans leurs structures secondaires et tertiaires, et déforment ainsi les enzymes. L'augmentation de la concentration de substrat, à concentration d'enzymes fixe, permet d'améliorer la vitesse de la réaction jusqu'à ce que l'augmentation de la concentration de substrat ne produise plus aucun changement significatif à la vitesse de réaction. En effet, lorsque les sites actifs des enzymes sont saturés par le substrat, le complexe enzyme/substrat doit d'abord se dissocier avant que les sites actifs soient libres pour accommoder davantage de substrat. L'augmentation de la concentration d'enzymes permet également d'augmenter proportionnellement la vitesse de la réaction, par la participation d'un plus grand nombre d'enzymes à la réaction. Cependant, au-delà d'une concentration trop élevée d'enzymes où toutes les molécules de substrat sont utilisées, la vitesse de la réaction ne peut plus être augmentée par la concentration d'enzymes.

La revue de la littérature ne rapporte aucune étude sur la résistance des enzymes aux contraintes de transfert à grande vitesse et à grande pression, par les méthodes conventionnelles d'impression et de couchage. Cependant, des travaux d'impression d'enzymes par jet d'encre [56, 57] et de couchage à lame d'enzymes micro encapsulés [58, 59] sont d'autres contributions originales en lien avec notre objectif de démonstration de la faisabilité de fabrication commerciale de papier bioactif.

Nonobstant la difficulté des enzymes à détecter directement des bactéries, l'enzyme HRP (Horse-radish peroxydase ou peroxydase de raifort) sera utilisée dans ce travail comme premier agent bioactif pour évaluer l'influence des contraintes de cisaillement subies par les agents bioactifs lors du procédé de fabrication. Le sous-objectif de thèse lié à l'utilisation des enzymes est de développer une méthode de fabrication de papier

²⁵ Substance transformée en un ou plusieurs produits par une activité enzymatique.

bioactif qui n'endommage pas l'intégrité des enzymes lors du procédé d'impression gravure, en étudiant l'influence des principaux paramètres d'ingénierie du procédé.

D'un point de vue du contact alimentaire, les papiers bioactifs développés à base d'enzymes permettent cependant la détection de peroxyde d'hydrogène qui peut alerter sur l'état d'oxydation d'un aliment donné [60]. La détection de peroxyde d'hydrogène est aussi utile dans les domaines pharmaceutiques, cliniques et industriels. De plus, les enzymes sont compatibles avec les applications de papier bioactif en contact alimentaire, car elles sont déjà largement utilisées dans les jus de fruits, les produits laitiers, comme attendrisseurs de viande ou encore en alimentation pour bébé. Les enzymes connaissent également un succès enviable dans l'industrie papetière, par rapport à tout autre agent bioactif. Les enzymes sont déjà utilisées pour dégrader l'amidon²⁶ et en réduire la viscosité afin de faciliter le couchage et l'encollage de papier. Les enzymes xylanases²⁷ aident au blanchiment de la pâte à papier [61]. Les enzymes cellulases²⁸ aident au désencrage de pâte recyclée [62] et améliorent l'égouttage de la suspension fibreuse lors de la formation de la feuille. Les enzymes lipases²⁹ réduisent les points de poix³⁰, tandis que les enzymes ligninases enlèvent la lignine³¹ de la pâte. Ces exemples d'utilisation laissent entrevoir que les enzymes démontrent une certaine tolérance aux contraintes environnementales, rencontrées lors l'une fabrication industrielle et à grande échelle.

2.3.3.1 L'enzyme HRP

L'enzyme peroxydase de raifort (HRP) est l'enzyme qui sera imprimée sur papier pour concevoir un papier bioactif de détection de la présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . L'enzyme HRP agira comme catalyseur de l'oxydation d'un colorant organique ABTS (acide 2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique, voir section 3.1.4) par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , lorsque ce dernier est détecté.

²⁶ Glucide qui agit comme réserve d'énergie et de nutriment, provenant de diverses parties de certaines plantes.

²⁷ Enzyme qui catalyse l'hydrolyse (décomposée par l'action de l'eau) du xylane (hémicellulose) en xylose (sucre de bois).

²⁸ Enzyme qui décompose la cellulose.

²⁹ Enzyme qui catalyse l'hydrolyse des fonctions ester ($R-CO-OR'$) de molécules lipides (ex. : acides carboxyliques).

³⁰ Formation de trous sur la feuille à cause de fibres de bois contenant beaucoup de résine.

³¹ Composant du bois et des pâtes à papier responsables de sa coloration jaunâtre après exposition au soleil.

L'enzyme HRP entre dans la classe des enzymes oxydoréductases qui catalysent des réactions d'oxydoréduction. Extraite en grandes quantités et à faible coût de la racine du raifort *Amoracia rusticana*, l'enzyme HRP est largement utilisée en biologie moléculaire pour sa capacité de catalyser l'oxydation³² d'une grande variété de molécules.

L'enzyme HRP a une structure secondaire en hélice alpha, formée par l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. L'enzyme HRP comprend également un cofacteur, un groupe prosthétique étroitement lié au site actif de l'enzyme et qui consiste en un ion métallique au centre d'un large anneau organique appelé porphyrine. Il est donc important que le procédé d'utilisation de l'enzyme HRP ne déstabilise pas la structure responsable de la bioactivité de l'enzyme. Les deux éléments les plus critiques à la stabilité de cette structure sont les liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de l'hélice et les radicaux orientés vers l'extérieur de l'hélice. La littérature révèle que certains acides aminés essentiels, tels que la valine, l'isoleucine et la tyrosine déstabilisent l'hélice alpha de l'enzyme HRP. D'autres acides aminés, tels que la leucine et le tryptophane stabilisent l'enzyme HRP. L'efficacité d'un biocapteur à base de l'enzyme HRP pourrait donc être influencée par la composition de l'aliment au contact de l'enzyme, sachant que ces acides aminés ne sont pas sous leur forme libre dans les aliments. La viande, les produits laitiers et les champignons contiennent de la valine. Le poisson, les œufs, le foie, la viande, le poulet et les produits laitiers contiennent de l'isoleucine. Le fromage contient de la tyrosine. Ces aliments pourraient influencer négativement la bioactivité d'un papier bioactif à base d'enzymes HRP, alors que le thon, le saumon, le bœuf et les œufs, qui sont abondamment riches en leucine et en tryptophane, ne seraient pas nuisibles à l'efficacité d'un papier bioactif à base d'enzymes HRP, en supposant l'absence d'autres éléments déstabilisants dans la matrice de ses aliments, qui seraient au contact du papier bioactif.

³² Réaction chimique dans laquelle un composé se combine avec un ou plusieurs atomes d'oxygène.

2.3.4 Bactériophages

Les bactériophages, communément appelés phages, sont des virus, c'est à dire des entités biologiques qui nécessitent une cellule hôte pour se multiplier. Le bactériophage peut infecter spécifiquement une bactérie pour la détruire en libérant son contenu : c'est de ce qui s'appelle la lyse de la bactérie par le bactériophage. Les phages peuvent également être utilisés dans le cadre de méthodes moléculaires (section 2.5.2.2) pour la détection de bactéries par bioluminescence d'ATP (adénosine-5'-triphosphate).

Les bactériophages sont majoritairement utilisés dans ce travail à cause d'un atout économique considérable qui est de pouvoir être fabriqués en quantité industrielle et à faible coût (sections 3.2.5). Le deuxième avantage de taille est que les phages permettent de détruire spécifiquement des bactéries pathogènes.

Les possibilités d'obtenir une homologation des phages naturels pour une utilisation en contact alimentaire sont aussi excellentes. En effet, les phages existent par millions dans notre système digestif, et nous en consommons des millions par notre alimentation et eau. De plus, des études de toxicité sur des rats [63], ainsi que sur des humains [64] ayant ingurgité de grandes quantités de phages n'ont montré aucun effet secondaire. L'organisme américain *Food and Drug Administration* (FDA, USA) a déjà autorisé en 2007 l'utilisation d'un cocktail de phages *Listex^{MC}* pour être pulvérisé directement sur des aliments afin de contrôler la présence potentielle de la bactérie *Listeria*. L'expérience d'une homologation réussie de phages pour contact alimentaire [65] nous impose une règle de sécurité simple, à savoir que les phages tempérés³³ et les phages capables de transduction³⁴ généralisée doivent être évités.

Les phages sont également les agents bioactifs qui conviennent le plus à l'application commerciale d'un emballage de contact alimentaire de contrôle de bactéries pathogènes présentes à la surface des aliments dits *prêt-à-la-consommation*. Ce type d'aliments est particulièrement vulnérable aux contaminations bactériennes.

³³ Bactériophage à ADN qui est capable d'intégrer son acide nucléique au chromosome d'une bactérie.

³⁴ Transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage.

L'aliment *prêt-à-la-consommation* est souvent consommé sans cuisson après avoir été préalablement coupé en usine par des outils de coupe qui sont des vecteurs de contaminations bactériennes sur la surface coupée de l'aliment.

L'objectif de thèse lié à l'utilisation des phages est de développer une méthode de fabrication d'un papier bioactif efficace pour détruire des bactéries au contact du papier, en développant une méthode de quantification de la bioactivité des papiers (section 4.2.2), en étudiant l'influence des principaux paramètres d'ingénierie du procédé qui n'endommagent pas l'intégrité des phages lors du procédé d'impression (section 4.2.4) et de couchage (section 4.2.5), en optimisant la sensibilité de détection des papiers bioactifs grâce à l'utilisation d'une précouche cationique (section 4.2.7), en étudiant l'influence de l'humidité du papier sur la bioactivité des phages (section 4.2.6) et en étudiant l'influence de la porosité des papiers bioactifs (sections 4.2.8 et 5.9).

Chaque phage est spécifique à une bactérie hôte. Dans le cas des bactéries pathogènes d'origine alimentaire, par exemple, le phage T4 est spécifique à la bactérie *E.coli* B, le phage P22 à la bactérie *Salmonella typhimurium* et le phage A118 est spécifique à la bactérie *Listeria monocytogenes*. Les phages peuvent avoir un cycle lytique (ils se répliquent dans une cellule bactérienne réceptive) ou lysogénique (inséré dans le génome sous la forme d'un prophage, il devient partie intégrante du génome de la bactérie).

2.3.4.1 Le bactériophage T4

Le bactériophage utilisé dans ce travail est le phage lytique T4 qui est spécifique à la souche non pathogène *E.coli* B, en tant que modèle pour d'autres bactéries pathogènes, et ce, en raison des contraintes de niveau de sécurité [22] dans nos laboratoires.

Physiquement, les phages T4 sont parmi les plus grands phages. Ils peuvent être représentés comme une molécule oblongue d'environ 200 nm de hauteur pour 20 nm de diamètre. En comparaison, la taille de la bactérie *E.coli* est de l'ordre du micromètre.

Pour comprendre la nature des interactions entre les phages T4 et les bactéries, il faut connaître la structure des phages T4.

Les données structurales sur les phages T4 sont aujourd'hui connues, de moins de 2nm jusqu'à la résolution atomique [66-68], grâce aux avancées en microscopie cryo-électronique³⁵ et en diffractométrie de rayons X³⁶. Tel qu'illustré à la Figure 2-5 [69], le phage T4 est constitué de plusieurs produits génétiques (gp) numérotés constitués de protéines qui remplissent différentes fonctions. Ce sont les fibres longues et les fibrines du phage qui détectent la présence d'une bactérie et qui sont impliquées dans l'attachement des phages à la bactérie. La base des fibres longues sécurise l'entrée de l'acide nucléique viral dans la bactérie. Le complexe queue-base du phage T4 est une machine moléculaire conçue pour délivrer de l'ADN à l'intérieur d'*E.coli*, tel un pistolet armé emmagasinant de l'énergie sous forme de protéines à conformation sous contrainte [69]. Six fibrines de 53 nm de longueur sont attachées en bas des bosses protubérantes du sommet portail de la tête. Les fibrines qui promeuvent l'attachement, l'extension et la rétraction des fibres longues de la queue, font partie du système de détection environnementale du phage et maintiennent les fibres longues en configuration rétractée et protégée jusqu'au besoin [70-72].

Le cycle de vie des phages T4 dure environ 30 minutes à 37°C et consiste en l'adsorption des phages, l'infection de la bactérie, et la libération de virions [73]. Au début du cycle d'adsorption, les fibres longues se libèrent de leur position de rangement au niveau des fibrines, ce qui permet aux fines extrémités des fibres longues (protéine gp37) d'interagir réversiblement avec les récepteurs externes de la bactérie [74]. Les fibres longues bougent à la surface de la cellule et transmettent l'information de conformation à la base du phage via la protéine gp9 qui va maintenir la base en position sous contrainte [75]. La liaison du phage avec la bactérie par au moins 3 fibres longues convertit la forme de la base de la queue du phage d'un hexagone en une structure extensible en étoile, ce qui a pour effet de faire sortir les fibres courtes gp12 de leur position rangée et pliée.

³⁵ Technique d'observation de particules isolées comme les virus. L'objet est observé à une température de -196°C ou -269°C.

³⁶ Technique d'analyse basée sur la diffraction des rayons X sur la matière cristalline.

Par la suite, le virus se lie irréversiblement avec la bactérie, grâce au contact de la protéine gp12 avec le récepteur de surface d'*E.coli* : les endotoxines Lipopolysaccharides LPS, un composant fortement antigénique de la membrane externe de la bactérie *E.coli* [69]. Le virus pénètre ensuite dans l'enveloppe cellulaire de la bactérie grâce à une structure en forme d'aiguille centrée sous la base du phage et composée des protéines gp27 et gp5 [76]. Durant cette étape, la protéine gp5 est clivée, et le domaine lysozyme de la protéine gp5 commence à digérer localement le peptidoglycane de la bactérie, ce qui apprête à l'injection de l'ADN [77]. Subséquemment, l'aiguille se met de côté ou se détache pour permettre la pénétration du tube de la queue dans la paroi de la cellule bactérienne. La dernière phase de l'infection est le transfert de l'ADN et de plusieurs protéines [69].

Bien comprendre la lyse bactérienne en milieu liquide est nécessaire pour déterminer et comprendre l'effet du papier sur les interactions entre phages et bactéries. Après l'adsorption des phages sur la bactérie, le cycle de vie des phages se poursuit par l'infection de la bactérie. L'acquisition et l'exploitation d'une bactérie par un phage impliquent que la bactérie ne peut plus être exploitée par un autre phage. L'infection de la bactérie commence par l'introduction du matériel génétique du phage dans la cellule bactérienne. Après cela le phage reproduit son génome et utilise le mécanisme métabolique de la bactérie pour synthétiser des enzymes de phages et des composants structurels de phage. Les parties de phages s'assemblent autour des génomes, et la libération de nouveaux virions coïncide avec la destruction de la bactérie [73]. Le nombre de virions largués varie généralement entre 50 à 200, et peut s'élever à 1000 virions prêts à infecter d'autres bactéries. Une fois les virions libérés de la cellule infectée, le cycle d'adsorption recommence et se termine avec l'adsorption à nouveau des génomes du virion dans le cytoplasme de la bactérie hôte. Plus l'adsorption des virions est rapide, plus leur cycle de vie est réduit [78] et plus la putréfaction de virions est évitée [79]. La putréfaction des phages est équivalente à leur mort [80]. La putréfaction des phages limite l'impact des phages sur les bactéries [81], et provient de l'incapacité des virions à survivre indéfiniment en l'absence de densité suffisante de bactéries [82, 83].

L'optimisation de la lyse bactérienne consiste à choisir une population de phages dont la productivité (nombre de virions produits par infection) est maximale, et dont le temps de génération de nouveaux virions est minimal [84, 85]. Tant et aussi longtemps qu'un virus reste à l'intérieur d'une bactérie infectée, il n'est pas libre d'infecter un nouvel hôte.

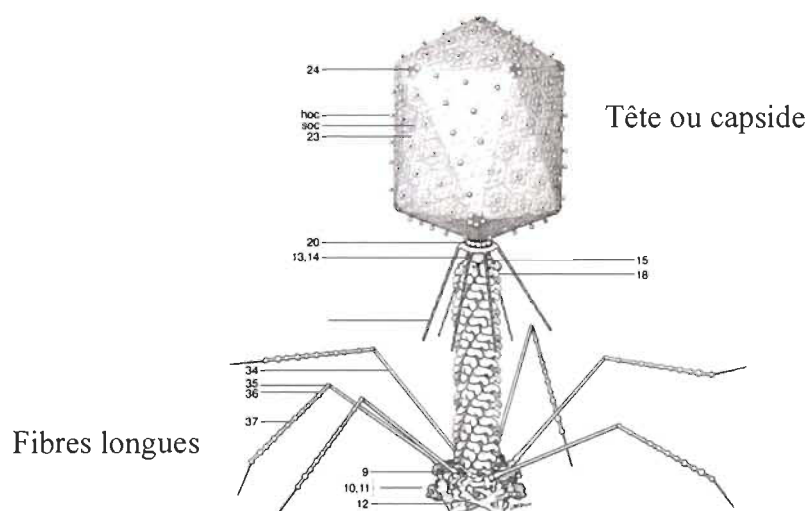


Figure 2-5 Structure du bactériophage T4 [69]

La première contrainte de développement de papier bioactif à base de phages est donc que les fibres longues des phages soient librement accessibles pour interagir avec les bactéries. Idéalement, l'orientation spatiale des phages perpendiculairement à la surface du papier devrait être optimisée. Une orientation optimale des phages augmenterait la capacité des phages à infecter des bactéries, augmenterait la sensibilité du papier bioactif et réduirait le temps de détection ou de destruction de bactéries. Une orientation optimale des phages serait obtenue en immobilisant le phage à la surface du papier depuis sa capsid (tête).

La tête du phage T4 est composée majoritairement de la protéine gp23 arrangée en un réseau de surface icosaédrique de 13 triangulations. Le sommet à partir duquel l'assemblage de la tête a été initié contient la protéine portail gp20 dont le rôle est l'empaquetage et l'éjection de l'ADN [69]. La tête des phages contient de l'ADN de différentes tailles [86].

La tête du phage T4 mesure 85nm de large et peut avoir 3 différentes longueurs [87]. La longueur de la tête est influencée par les interactions entre les protéines de la tête et la concentration de protéines [69] ; le changement d'un seul acide aminé de la protéine gp23 peut altérer la longueur de la tête du phage [69].

La compréhension de la structure de la tête des phages permet de modifier génétiquement la tête des phages dans le but d'immobiliser spécifiquement le phage au niveau de sa tête, de manière à laisser libre son site actif (ses fibrines) pour détecter et détruire la bactérie ciblée. Cependant, la modification génétique pose un problème d'ordre public et d'homologation, particulièrement en emballage alimentaire, quant au largage de microorganismes recombinés. Ainsi, la méthode d'immobilisation d'agents bioactifs doit être soigneusement sélectionnée.

Lorsqu'un support papier est utilisé, l'interaction entre les phages et les bactéries peut être influencée par d'autres facteurs significatifs. La revue de littérature n'ayant fait l'objet d'aucune publication sur l'effet du papier sur les interactions entre les phages et le papier, des études ont été menées aux sections 5.8 et 5.9 pour évaluer l'influence des propriétés de charge électrostatique et de porosité sur l'efficacité des papiers bioactifs.

2.4 Méthodes d'immobilisation d'agents bioactifs à la surface du papier

Pour développer un papier bioactif, nous avons vu précédemment qu'il est important de choisir une méthode appropriée d'immobilisation d'agents bioactifs à la surface du papier. La présente étude de la littérature concerne uniquement l'immobilisation d'enzymes et de phages, car ce sont les deux agents bioactifs qui ont été choisis à la section précédente et dans notre travail de thèse. Les méthodes d'immobilisation d'anticorps et d'aptamères ne seront pas traitées, car ces derniers ne seront pas utilisés.

Les méthodes potentielles d'immobilisation d'agents bioactifs sont nombreuses. La revue de littérature nous a permis de faire un choix éclairé en fonction des avantages et des limitations de chaque méthode. En environnement aqueux, l'interaction entre biomolécules est déterminée par la combinaison de forces physiques et chimiques, incluant la solvation, les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals,

les forces hydrophobiques et les liaisons covalentes [88]. De manière générale, la nature d'immobilisation de biomolécules à la surface de papier est une combinaison d'adsorption physique, de liaison covalente et d'emprisonnement physique [89].

Il existe d'autres méthodes prometteuses d'immobilisation de biomolécules telle que l'immobilisation de biomolécules sur des particules colloïdales pour fabriquer des pigments bioactifs pour bioencre ou des sauces de couchages bioactive, qui peuvent ensuite être imprimées, couchées ou incorporées lors de l'étape de formation du papier. Ces méthodes ne sont pas détaillées ici, mais leurs avantages sont nombreux : 1) l'étape de greffage peut être réalisée en dehors des installations industrielles papetières ; 2) il est possible de concentrer les particules colloïdales sur la surface du papier ; et 3) l'environnement autour de l'agent bioactif est davantage lié aux propriétés chimiques des particules colloïdales, et non aux variations des propriétés du support papier [90].

Dans le contexte du réseau Sentinel, l'étude et le développement de méthodes originales d'immobilisation d'agents bioactifs à la surface du papier relèvent du mandat des chercheurs du thème «sciences de surface». En tant que chercheurs au thème « sciences des matériaux », notre mandat est plutôt de choisir une méthode d'immobilisation d'agents bioactifs qui soit adaptée à notre objectif de démonstration de la faisabilité de la fabrication industrielle d'un emballage bioactif pour le contrôle de bactéries. Pour atteindre notre objectif, l'étape de sélection d'une méthode d'immobilisation d'agent bioactif reste un compromis entre un objectif d'efficacité et de sensibilité du papier bioactif, une qualité d'adhésion requise, un coût tolérable, une vitesse de réalisation permettant une fabrication industrielle, une prise en compte des propriétés du substrat papier, une stabilité du biocapteur lors de l'immobilisation (changement de structure, réduction de bioactivité), une possibilité de lavage ou de lessivage des agents bioactifs non immobilisés sans endommager ceux immobilisés, ainsi que le respect de la méthode d'immobilisation aux contraintes de réglementation en vigueur pour un contact alimentaire avec des agents bioactifs génétiquement ou chimiquement modifiés.

Pour que le papier bioactif soit viable économiquement à l'échelle industrielle, il est important que les agents bioactifs puissent être immobilisés à faible coût. Dans le cas de développement d'un emballage bioactif pour le contrôle de contaminations alimentaires, l'immobilisation covalente des agents bioactifs peut nuire à l'efficacité du papier bioactif, dont la diffusion des agents bioactifs vers l'aliment représente une des propriétés fonctionnelles bénéfiques recherchées. Une immobilisation physique ou électrostatique permet la diffusion de l'agent bioactif dans l'aliment. Le choix s'est donc porté vers cette dernière option. Pour que cette option soit viable, il faut aussi s'assurer que la diffusion de l'agent bioactif vers les aliments puisse être homologuée par les organismes de réglementation. Notre choix d'utiliser des bactériophages naturels, non génétiquement modifiés comme agent bioactif améliore les chances de voir cette homologation accordée. L'avantage d'immobiliser des phages naturels est aussi le moindre coût par rapport à l'immobilisation de phages génétiquement modifiés. L'inconvénient de cette méthode est sa faible force d'adhésion et la difficulté de contrôler la distribution des phages dans la structure du papier, mais nous verrons que ces inconvénients n'empêchent pas d'atteindre l'objectif de développement d'un papier bioactif efficace à base de bactériophages.

2.4.1 Immobilisation physique d'agents bioactifs

L'immobilisation physique d'agents bioactifs à la surface du papier est une combinaison de forces électrostatiques et de forces de liaison de Van der Waals.

Les forces d'interactions électrostatiques sont de longue portée et jouent un rôle vital dans les interactions intra- et intermoléculaires [91]. Les interactions intermoléculaires sont dominées par les forces électrostatiques, ce qui est important considérant que ces interactions sont la première phase des processus biomoléculaires. La liaison hydrogène est une interaction majoritairement (90%) électrostatique [92] dont l'énergie est dix fois supérieure à l'énergie de Van der Waals, mais vingt fois plus faible qu'une liaison covalente classique.

Les interactions électrostatiques sont importantes, mais complexes ; des techniques de modélisation ont donc été développées [91, 93, 94] pour représenter l'énergétique électrostatique d'un système de biomolécules et améliorer la compréhension de la contribution des forces électrostatiques sur la stabilité, les fonctions et les interactions moléculaires. En milieu aqueux, l'électrostatique permet d'étudier quantitativement les molécules chargées et polaires, notamment la description des potentiels électriques, les processus limités par la diffusion, les propriétés des protéines dépendantes du pH et les phénomènes dépendants de la force ionique [95]. Lors d'une immobilisation électrostatique de biocapteurs à la surface du papier, la rencontre moléculaire est d'abord initiée par la diffusion des biocapteurs de leur véhicule vers le papier. Cependant, le taux de diffusion limite certaines réactions d'agents bioactifs tel que les enzymes et peut expliquer l'influence des comportements d'orientation dans les réactions chimiques [91].

Les forces de liaison de Van der Waals sont des interactions dipolaires impliquées dans les phénomènes de capillarité du papier. Lors des interactions papier/agents bioactifs, ces forces peuvent intervenir, dépendamment de la nature des biomolécules impliquées : en présence de molécules polaires, la force de Van der Waals s'ajoute à la force purement électrostatique entre les dipôles permanents, mais en présence de molécules à symétrie sphérique ou d'atomes, la force de Van der Waals est la seule qui entre en jeu pour ces distances.

Notre méthode d'immobilisation d'agents bioactif sera donc de nature physique, consistant à incorporer une solution bioactive à la surface du papier. Le fait d'incorporer des agents bioactifs à la surface du papier sans les y attacher peut causer le lessivage des agents bioactifs lorsque le papier bioactif est lavé à l'eau. L'effet migratoire des agents bioactifs est expliqué dans plusieurs brevets [96-98]. La migration des agents bioactifs serait bénéfique lors d'une utilisation de papier bioactif pour l'emballage d'aliments humides, car cela favoriserait la probabilité de contact entre les agents bioactif et les bactéries potentiellement présentes dans l'aliment. De plus, les méthodes de fabrication de papier bioactif qui seront utilisées (sections 3.3.3 et 3.3.5) permettent de contrôler de manière acceptable la distribution des agents bioactifs dans la structure du papier.

2.4.1.1 Immobilisation physique d'enzymes

Le mécanisme d'adsorption physique des enzymes sur le papier [99] ou sur la cellulose [100] est majoritairement dû aux forces d'interactions électrostatiques, favorisées par les forces capillaires et la nature hydrophile du papier [90].

Les protéines ne s'adsorbent pas toutes identiquement sur la cellulose. La gélatine, par exemple, est un produit protéiné qui affiche un taux d'adsorption élevé sur la cellulose [101]. L'enzyme cellulase présente également de l'affinité et de la spécificité pour une immobilisation sur la cellulose [102, 103].

L'adsorption physique d'enzymes HRP à la surface du papier a été réalisée par imprimante jet d'encre, en utilisant différents modificateurs de viscosité [56]. Lors de ces expériences, il a été constaté que les modificateurs de viscosité ont une influence significativement négative sur la bioactivité de l'enzyme HRP, à l'exception du polymère carboxyméthylcellulose (CMC). Ce polymère sera le modificateur de viscosité utilisé pour la formulation d'encre bioactive à base d'enzyme HRP pour l'impression gravure (section 3.3.1).

2.4.1.2 Immobilisation physique de bactériophages

Comme pour les enzymes, le mécanisme d'adsorption physique des phages à la surface du papier est une combinaison de forces de Van der Waals et de forces électrostatiques, favorisées par les forces capillaires et la nature hydrophile du papier [90].

L'adsorption physique de phages sur une surface est affectée par la nature des phages, la nature de la surface, la force ionique et le pH [104]. Une étude de l'adsorption de phages T4 à la surface de la cellulose [105] a montré que les phages naturels se fixent à la cellulose. Les auteurs ont spéculé que les phages interagissent avec la cellulose à l'aide de leurs fibres de queue utilisées pour s'adsorber à la surface de la bactérie. La revue de littérature n'indique que deux études [105, 106] d'immobilisation de la tête du phage à la surface d'un substrat, par modification génétique de la tête du phage. Ces deux études ont montré que les phages génétiquement modifiés au niveau de leur tête affichent une meilleure immobilisation que les phages naturels.

L'immobilisation de phages sur un substrat a déjà été développée [107] par immobilisation passive de phages similaires aux phages T4 sur des bandelettes de polystyrène, mais l'efficacité de capture de bactéries a été faible. L'adsorption physique de phages à la surface d'or d'un capteur QCM (Quartz Crystal Microbalance) [108] a permis de détecter des protéines. Pour mieux comprendre le rôle des forces électrostatiques dans l'adsorption de phages sur des surfaces solides, des particules de silice modifiées ont été utilisées, et ont montré que le pH du milieu de dispersion affecte grandement l'adsorption des phages [109].

2.4.2 Immobilisation chimique d'agents bioactifs

L'adsorption chimique met en jeu des énergies de liaison plus importantes, et difficilement réversibles. Les techniques d'adsorption chimique de biomolécules sont aussi appelées techniques de bioconjugaison [110]. L'avantage de l'adsorption chimique est la grande qualité de liaison qui peut être requise par l'utilisation finale du papier bioactif. Cependant, l'inconvénient de l'adsorption chimique est un coût de développement élevé, un temps de production élevé, et la sensibilité de la biomolécule immobilisée aux changements de structure et la réduction d'activité. En effet, plusieurs protéines peuvent perdre leur activité biologique par dénaturation, déshydratation ou oxydation [89]. Les réactions de bioconjugaison nécessitent la présence favorable de groupes fonctionnels à la surface du papier. Cette présence nécessite une réaction chimique d'activation avec une petite molécule ou un polymère [111]. Souvent, la surface de la biomolécule est dérivatisée avec un lieur chimique homo-bifonctionnel³⁷ ou hétéro-bifonctionnel³⁸ qui agit comme un pont entre le papier et la biomolécule [89]. Le glutaraldéhyde est un exemple de liant homo-bifonctionnel contenant deux groupes aldéhyde réactifs à l'égard d'amines primaires. Les groupes fonctionnels de biomolécules utilisables en immobilisation chimique sont les amines primaires, les sulfhydryles, les carbonyles, les acides carboxyliques et les hydrates de carbone [89].

³⁷ Qui contient deux groupes réactifs identiques.

³⁸ Qui contient deux groupes réactifs différents.

De nombreuses études d'activation d'une surface cellulosique ont été menées afin de réaliser la bioconjugaison d'agents bioactifs tels que des aptamères [111], des anticorps [112] et des ADN [113]. L'immobilisation chimique a été appliquée à des protéines [114], anticorps [115] et peptides [116]. Cependant, à cause des différentes propriétés physico-chimiques et de structure de ces biomolécules, le greffage covalent est mené à conditions contrôlées de pH, force ionique, nature du tampon et température [117]. Outre les coûts des réactifs et les équipements nécessaires, il est difficile d'imaginer que cette technique compliquée soit adoptée au sein d'une usine papetière de transformation. L'immobilisation chimique pourrait cependant être intéressante pour la préparation d'encre ou de sauces de couchage bioactives.

2.4.2.1 Immobilisation chimique d'enzymes

L'immobilisation chimique d'enzymes à la surface d'un support en papier est possible grâce aux groupes fonctionnels qu'offrent la cellulose, l'hémicellulose, la lignine et les extractibles pour une bioconjugaison directe.

Cependant, ces groupes fonctionnels sont peu réactifs; *i.e.* la surface du papier doit d'abord être activée par une réaction avec une petite molécule ou un polymère afin de générer des groupes fonctionnels appropriés à une réaction de bioconjugaison subséquente [90]. Comme exemple d'application de papier bioactif pour supprimer les traces d'urée dans un aliment, l'immobilisation chimique de l'enzyme Uréase a été investiguée à la surface d'un papier filtre de cellulose en donnant à ce dernier des groupes fonctionnels, en utilisant le méthacrylate de glycidyle (GMA) comme monomère et le nitrate d'ammonium cérique (CAN) comme initiateur chimique, afin que les groupes fonctionnels introduits en surface permettent une liaison covalente entre les groupes amines de l'enzyme et les groupes époxy du support [118]. La copolymérisation par greffage de GMA sur le papier filtre a été réalisée par initiation chimique en utilisant CAN, sous atmosphère d'azote, avec lavage du papier à l'acétone, et agitation durant 16 heures. Cependant, les différentes étapes chimiques que nécessite l'immobilisation chimique d'enzymes ne sont pas envisageables dans le cadre d'une fabrication à grande échelle de papiers bioactifs peu dispendieux.

2.4.2.2 Immobilisation chimique de bactériophages

L'immobilisation chimique de phages à la surface d'un support est théoriquement possible. La liaison covalente entre des phages et une surface d'or a été effectuée en attachant la protéine biotine à la tête des phages et en appliquant une couche de protéine streptavidine sur la surface d'or en exploitant l'affinité naturelle du système biotine/streptavidine. Cette immobilisation a été 15 fois supérieure à l'adsorption physique de phages naturels à la surface d'or [106]. Dans une autre étude, des phages T4 ont été modifiés pour comporter soit un polypeptide s'attachant à la biotine, soit un module d'attache à la cellulose CBD (*cellulose binding domain*). Ces phages T4 ont été immobilisés soit à la surface d'un substrat fonctionnalisé par streptavidine, soit à la surface d'un substrat cellulosique [105]. Ces phages ont maintenu un haut niveau d'infectivité et ont capturé 70 à 100% des bactéries *E.coli* d'une suspension contenant 10 à 10^6 ufc.mL⁻¹ en 30 minutes. Il n'est toutefois pas concevable que l'immobilisation chimique de phages puisse être exploitée pour la fabrication à grande échelle de papier bioactif de commodité, à cause des multiples étapes chimiques que cela nécessiterait.

2.5 Méthodes de lutte contre les contaminations alimentaires

2.5.1 Méthodes de contrôle d'agents pathogènes alimentaires

Les méthodes de contrôle sont des méthodes de désactivation d'agents pathogènes. Le terme *contrôle* est plus approprié que celui de destruction, car les agents pathogènes ne sont jamais tous complètement détruits.

L'étude des méthodes existantes pour le contrôle d'agents pathogènes alimentaires est nécessaire afin de pouvoir définir l'avantage concurrentiel d'une utilisation future d'un papier bioactif pour le contrôle de bactéries alimentaires, juste avant la consommation de l'aliment. Dans ce cas, l'avantage concurrentiel est manifeste, car il n'existe pas de méthodes de contrôle d'agents pathogènes sur les aliments, entre leur préparation et leur consommation, à l'exception du strict respect des règles d'hygiène et de salubrité lors de la cuisson et de la manipulation des aliments.

La littérature nous informe cependant qu'il existe huit grandes méthodes de salubrité pour l'assainissement des aliments lors de leur préparation [119], à savoir les méthodes thermiques (chaleur ou eau chaude), la méthode par radiation, la méthode par forte pression hydrostatique, la méthode vide/vapeur/vide, l'assainissement chimique (composés chlorés, iodés, bromés, acides ou d'ammonium quaternaire), l'assainissement par acides anioniques (acide à base d'ammonium quaternaire, peroxyde d'hydrogène, ozone, glutaraldéhyde ou microbiocides) et l'assainissement par acide peroxyacétique.

2.5.2 Méthodes de détection d'agents pathogènes alimentaires

Les techniques de détection d'agents pathogènes ont été étudiées, car en dépit de notre contexte spécifique de développement de papier bioactif pour le contrôle (destruction) de bactéries, le simple fait de devoir mesurer l'efficacité du papier nous amène à mesurer la bioactivité, donc d'une certaine manière à détecter les agents pathogènes en surface d'un papier traité pour être bioactif.

Il faut d'abord considérer que le seuil réglementaire de présence de bactéries pathogènes est de moins d'une bactérie par millilitre d'eau ou par 25 g d'aliment [120].

Il existe plusieurs techniques de détection de contaminations alimentaires [15], mais aucune technique de détection ne satisfait tous les critères de performance nécessaires ; *i.e.* la spécificité (affichage de résultats positifs sur fond de cellules non ciblées), la sensibilité (seuil minimal pour la détection de bactéries, exprimé en ufc.mL⁻¹), la rapidité à obtenir des résultats, le faible coût par analyse, l'acceptabilité par la communauté scientifique, l'acceptabilité par le grand public, la facilité d'utilisation et la standardisation de l'interprétation des données et des protocoles [121, 122].

La méthode de détection d'agents pathogènes que nous avons ciblée et développée (section 5.2) pour quantifier l'efficacité de notre papier d'emballage bioactif à base de phages pour le contrôle de contaminations alimentaires est basée sur les techniques classiques de culture microbiologiques (section 2.5.2.1).

2.5.2.1 Les techniques de culture microbiologiques traditionnelles

Les techniques de culture traditionnelle sur boîte de Petri et mesure de zones de lyse de bactéries par des bactériophages sont les méthodes de détection de bioactivité par excellence lors du développement, contrôle d'efficacité et certification de nouveaux papiers bioactifs à base de bactériophages pour le contrôle de contaminations alimentaires.

Les techniques de culture microbiologiques traditionnelles permettent de diagnostiquer les contaminations alimentaires. Les méthodes d'analyse des bactéries d'origine alimentaires *Listeria*, *Salmonella* et *E.coli* O157:H7 sont normalisées [123-125]. Les techniques sont basées sur l'habilité des cellules bactériennes à se multiplier dans un milieu de culture riche en nutriments et contenant des agents sélectifs (inhibant la croissance d'organismes non ciblés) et différentiels (*i.e.* ils différencient les organismes ciblés d'autres non ciblés) [126].

Les méthodes de culture permettent de détecter qualitativement la présence ou l'absence de bactéries. La détection qualitative de bactéries se fait en étapes séquentielles [127] : le pré-enrichissement et l'enrichissement sélectif, la culture en gélose et la confirmation par des méthodes moléculaires immunologiques (section 2.5.2.2).

Les étapes de pré-enrichissement et d'enrichissement sélectif ne sont pas obligatoires, mais contribuent à la sensibilité de la méthode : le pré-enrichissement permet la réparation et la croissance de bactéries endommagées, mais nécessite un temps d'incubation de 16 à 20 heures [128]. L'enrichissement sélectif permet d'obtenir un bon rapport espèce cible/espèces concurrentes [127].

L'étape de culture en gélose représente la phase de détection de pathogènes et consiste à transférer une aliquote de 10 µl de bouillon de culture liquide³⁹ sur un milieu de culture solide⁴⁰ (boîte de Petri). La présence d'une seule colonie suffit pour affirmer la contamination de l'échantillon analysé.

³⁹ Milieu comprenant les éléments chimiques nécessaires à la croissance de bactéries.

⁴⁰ Milieu de culture de consistance solide. Le plus courant de ces milieux est la gélose ou gel d'agar-agar.

Théoriquement, la culture en gélose peut détecter seulement 100 bactéries.mL⁻¹ d'échantillon [127]. En pratique, la sensibilité de détection est de 10⁵ bactéries.mL⁻¹ considérant la perte de viabilité⁴¹ des bactéries [127] ; *i.e.* les bactéries n'auront pas survécu pour pouvoir se développer sur le milieu de culture (différent de la zone de lyse que nous verrons plus tard).

Les méthodes de cultures traditionnelles ont l'avantage d'être fiables, sensibles, abordables économiquement et acceptées universellement. Cependant, les méthodes de culture sont lentes (jusqu'à 24 à 48 heures d'attente de résultat), demandent un degré modéré de compétences, et sont moins sensibles que les méthodes moléculaires [15].

2.5.2.2 Les techniques de détections moléculaires immunologiques

Bien qu'elles ne soient pas expérimentées dans ce travail, les techniques moléculaires immunologiques sont ici revues, dans le contexte de papier bioactif, parce qu'elles apportent une réponse aux exigences de rapidité de détection (résultat entre 10 et 15 minutes) de bactéries pathogènes [15] ; une caractéristique dont souffrent les méthodes microbiologiques traditionnelles.

Les techniques moléculaires immunologiques conviendraient davantage lorsque l'utilisateur final dispose du matériel et de l'expertise technique pour mener une étape d'extraction d'acide nucléique (méthode PCR pour *polymerase chain reaction*) ou lorsque la matrice alimentaire ou des contaminants peuvent interférer et qu'il reste important de cibler une bactérie pathogène spécifique (recours à la méthode ELISA et la bioluminescence d'ATP).

La méthode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est la méthode moléculaire la plus largement acceptée pour détecter spécifiquement les antigènes de bactéries pathogènes dans les aliments, tels que *E.coli* O157:H7 et *Salmonella* [129-131].

⁴¹ Faculté des bactéries à pousser et à former des colonies visibles sur des milieux solides (boîtes de Petri).

Le format du test ELISA consiste en une plaque de micro-titration composée de puits de 25 ou 50 μl . Des anticorps spécifiques à la bactérie ciblée, appelés anticorps de capture, sont immobilisés sur la surface des puits. La méthode de détection consiste à remplir les puits par des échantillons contenant potentiellement l'antigène à analyser. Après une courte étape d'incubation, les puits sont rincés pour éliminer l'antigène non lié. Des anticorps conjugués à une enzyme, appelés anticorps de détection, sont ajoutés aux puits. Les deux anticorps forment alors un « sandwich » de l'antigène à détecter. Les puits sont rincés une deuxième fois et un substrat (fluorophore) convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté. Le résultat est enfin analysé "à l'œil" ou dans un spectrophotomètre.

La méthode ELISA a l'avantage d'être rapide, spécifique, de format pratique et peut être utilisée sur le terrain. Elle est automatisable, adaptée à de grands nombres d'échantillons, et permet un nettoyage d'échantillon minimal avec une sensibilité et sélectivité relativement grande. Cependant, le seuil de détection (sensibilité) typique de la méthode est de 10^4 ufc.mL^{-1} selon l'aliment analysé [132, 133], ce qui peut être parfois insuffisant. Le coût d'analyse d'un échantillon varie entre 25\$ et 50\$. Pour obtenir des résultats reproductibles, des opérateurs spécialistes et entraînés sont nécessaires. La spécificité et la sensibilité de la méthode peuvent être réduites par les contraintes environnementales des bactéries alimentaires [43] et l'utilisation d'anticorps polyclonaux (pouvant détecter plusieurs antigènes) au lieu d'anticorps monoclonaux beaucoup plus coûteux [37].

La méthode de séparation immunomagnétique IMS (*Immuno Magnetic Separation*) permet de séparer, isoler, enlever sélectivement, concentrer et capturer des bactéries telles que *E.coli*, *Listeria* et *Salmonella* [134-137] à partir d'une matrice alimentaire mise en solution. La méthode IMS consiste à mélanger à une pâte alimentaire, des billes paramagnétiques sur lesquelles sont fixés des anticorps. Les billes interagissent avec les antigènes en surface des bactéries. La substance est exposée à un champ magnétique qui attire les bactéries de la suspension. Les bactéries sont ensuite capturées et énumérées par milieu de culture traditionnelle ou par une méthode moléculaire, telle que ELISA [138, 139].

L'avantage de la méthode IMS est qu'elle permet d'améliorer la vitesse et la sensibilité de la détection de bactéries alimentaires en présence de matrices alimentaires complexes. Cependant, le faible taux de capture de bactéries (entre 10 et 70%) nécessite un pré-enrichissement de la suspension de pâte alimentaire [37].

L'agglutination passive au latex consiste à mélanger en suspension un échantillon à analyser avec des billes de latex contenant des anticorps spécifiques à la bactérie ciblée. Après quelques minutes, un rassemblement visible est observé si la réaction est positive comparativement aux échantillons de contrôle. Le principal avantage de cette méthode est sa spécificité. Cependant, la méthode requiert également une étape préliminaire d'enrichissement et d'isolation [15].

La méthode de cytométrie en flux est très appropriée à la détection d'un faible nombre de pathogènes en milieu liquide, tel que l'énumération de virus dans l'eau de mer [140]. La méthode est sensible et rapide, avec un seuil de détection de 10^2 à 10^3 bactéries par mL et un résultat en quelques minutes [141]. Cependant la méthode ne distingue pas entre cellules vivantes et cellules mortes [142] et son efficacité est influencée par l'interférence de la matrice alimentaire [143], réduisant le potentiel de la méthode pour la détection d'agents pathogènes dans des aliments. La méthode consiste à faire traverser un échantillon par un faisceau lumineux laser. La lumière est diffusée et absorbée par les microorganismes. L'ampleur et la nature de la diffusion sont une propriété intrinsèque des microorganismes. La lumière diffuse peut être analysée par un système de lentilles et de photodétecteurs.

La méthode par épifluorescence permet d'analyser optiquement des cellules individuelles de microorganismes dans des matrices alimentaires complexes, afin d'estimer leur nombre, leur taille et leur forme [144]. La méthode est sensible, fiable et rapide avec l'obtention d'un résultat en 10 minutes. La fiabilité de détection de bactéries sur de la viande crue émincée est même équivalente à la fiabilité de détection par méthodes de culture traditionnelles [145].

La méthode par épifluorescence consiste à énumérer les microorganismes grâce aux propriétés d'immobilisation du fluorochrome⁴² orange acridine [141]. L'échantillon alimentaire est d'abord prétraité avec des détergents et des enzymes protéolytiques⁴³. L'échantillon est ensuite filtré à travers une membrane en polycarbonate⁴⁴, coloré avec le fluorochrome orange acridine, puis examiné sous microscope fluorescent [141]. Le nombre de bactéries viables est obtenu par le décompte des cellules orange sur le filtre.

La méthode de bioluminescence d'ATP permet la détection des microorganismes dans des aliments en 15 minutes [146] avec une sensibilité de 10^4 ufc.mL⁻¹ [15], lorsqu'il n'est pas nécessaire d'isoler, récupérer ou identifier une bactérie spécifique. L'ATP ou Adénosine TriPhosphate est un nucléotide impliqué lors des réactions de métabolisme cellulaire - en transportant l'énergie chimique accumulée dans les liaisons phosphate de l'ATP - qui indique la viabilité des organismes. La méthode de bioluminescence d'ATP consiste à convertir cette énergie chimique en lumière visible quantifiable [147]. Le manque de spécificité de la méthode peut être amélioré grâce au recours aux bactériophages [148, 149].

2.5.2.3 Les techniques de détection à base de bactériophages

Les méthodes de détection de bactéries à base de phages sont revues parce que les phages utilisés dans ce travail ont nécessité de mesurer leur bioactivité sur le papier, *i.e.* détecter la bioactivité des phages. En fait, nous parlons d'une manière générique de « bioactivité des papiers » alors que nous devrions parler de bioactivité des phages qui sont les éléments actifs. En définitive, notre mesure de la bioactivité des phages sur le papier consiste à générer une lyse de bactéries autour de disques de papier bioactif et de quantifier la taille de la zone de lyse correspondante (section 4.2).

L'intérêt des méthodes de phages amplificateurs et de phages rapporteurs bioluminescents est leur spécificité et leur faible coût [150].

⁴² Substances composées de noyaux aromatiques conjugués, capables d'émettre de la lumière fluorescente après excitation.

⁴³ Enzymes qui hydrolysent et décomposent les protéines.

⁴⁴ Membrane de type « tamis » qui retient les particules à la surface, minimisant leur emprisonnement à l'intérieur du filtre.

Néanmoins, ces méthodes sont limitées par la présence systématique, dans une population bactérienne, de bactéries mutantes⁴⁵ pouvant résister aux phages [120].

La méthode à base de phages amplificateurs permet la détection de *Listeria*, *Salmonella* et *E.coli* [120] en laboratoire, et la commercialisation du test FASTPlaques^{MC} pour la détection de *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch) [151]. La détection d'une bactérie ciblée se déroule en 6 étapes [152, 153] : 1) des phages spécifiques aux bactéries à détecter sont ajoutés à l'échantillon, 2) en présence des bactéries ciblées, les phages peuvent s'y fixer et introduire leur acide nucléique dans le cytoplasme de la bactérie, 3) un virucide⁴⁶ est ajouté afin de détruire les phages libres n'ayant pas réussi à infecter une bactérie, 4) le virucide est neutralisé, des bactéries « aidantes⁴⁷ » sont mélangées à l'échantillon et le mélange est réparti à la surface d'un milieu de culture. Après la répllication complète des phages, 5) la lyse de la bactérie cible intervient et les progénitures de phages sont larguées et peuvent infecter les bactéries aidantes. Enfin, 6) les bactéries sont détectées visuellement sous forme de plage de lyse. Chaque plage de lyse indique la présence d'une bactérie cible de l'échantillon original.

La méthode de détection avec des phages rapporteurs bioluminescents est la méthode de détection à base de phages la plus développée pour détecter *Listeria* [154], *Salmonella* [155, 156], *E.coli* [157], et d'autres bactéries entériques [158] avec une sensibilité d'une bactérie par gramme d'aliment après 20h de pré-incubation, dans des œufs entiers [156], de l'eau [155], et/ou du fromage [159].

La construction de phages rapporteurs consiste à insérer des gènes⁴⁸ rapporteurs⁴⁹ dans un emplacement non essentiel du génome du phage [160, 161] et utiliser le phage pour introduire le gène dans une bactérie [120]. Les lysats⁵⁰ de bactéries sont ensuite détectés par bioluminescence d'ATP [148, 162] avec un luminomètre, voire d'autres systèmes [163, 164], ou en utilisant un film photographique [165].

⁴⁵ Bactéries possédant un segment d'ADN ayant subi une modification anormale.

⁴⁶ Substance active qui détruit l'infectiosité d'un virus en dehors de la cellule dans laquelle il doit s'introduire et se multiplier.

⁴⁷ Bactéries qui aident à la répllication du phage.

⁴⁸ Séquence ordonnée de nucléotides constituant une information génétique et définie selon ses fonctions, rôles et localisation.

⁴⁹ Gènes dont l'expression (transcription et la traduction de l'information génétique) produit un signal.

⁵⁰ Suspension de bactériophages résultant de la lyse d'une culture de bactéries infectées ou de bactéries lysogènes induites.

Les avantages de la méthode de phages rapporteurs bioluminescents sont la sensibilité de détection spécifique d'une à 10 bactéries par 25g d'aliments simples et de 200 bactéries dans des aliments complexes [120], sans besoin de purification, d'enrichissement ou de culture en milieu sélectif. La sensibilité de détection dépend du phage et du gène rapporteur utilisés (10^4 bactéries avec le phage virulent⁵¹ TM4 [166] et 100 bactéries avec le phage tempéré⁵² L5 [161]). L'application commerciale de détection de *Salmonella* permet même d'améliorer la sensibilité à 2 bactéries.mL⁻¹ en 3 heures grâce à une double amplification du signal [167]. Les inconvénients de la méthode de phages rapporteurs bioluminescents sont liés à leur modification génétique. Pour chaque phage employé, de l'ingénierie génétique⁵³ est ici nécessaire. Néanmoins, l'apparition de nouvelles sous-espèces virulentes, comme *E.coli O157:H7*, requiert une adaptation facile des méthodes de détection. De plus, l'utilisation de phages génétiquement modifiés viables et pouvant se répliquer pose un problème d'ordre public quant au largage de microorganismes recombinés⁵⁴, restreignant leur utilisation à des laboratoires spécialisés, à moins de construire un phage « verrouillé » [168] qui ne peut se multiplier qu'en présence d'une bactérie spécialement construite portant le gène essentiel manquant au génome⁵⁵ du phage [120].

2.6 Papiers pour la lutte contre les contaminations alimentaires

Il est important d'estimer les avantages et les limitations des papiers bioactifs déjà existants. La revue de littérature portera particulièrement sur les méthodes de fabrication et les contraintes d'utilisation des papiers existants, en lien avec notre objectif décrit à la section 1.3. De plus, la revue a corroboré nos prémisses, à savoir que la méthode et le coût de fabrication sont souvent des défis à la commercialisation de la plupart des solutions développées en laboratoire.

⁵¹ Bactériophage qui est capable de se multiplier à l'intérieur d'une bactérie, puis d'en provoquer la lyse.

⁵² Bactériophage à ADN qui est capable d'intégrer son acide nucléique au chromosome d'une bactérie.

⁵³ Incorporation de matériel génétique étranger dans un phage pour modifier les caractères héréditaires du phage.

⁵⁴ Abritant un gène (brin d'ADN) ayant subi un échange d'information génétique entre deux différents secteurs du génome.

⁵⁵ Ensemble du matériel héréditaire d'un organisme et composé d'acides nucléiques (ADN ou ARN).

Cette revue nous a en outre permis d'orienter notre méthodologie de recherche et définir notre contribution originale de lutte contre les contaminations alimentaires. Notre application commerciale est donc ciblée sur la production d'un emballage alimentaire bioactif pour le contrôle et la désactivation de bactéries à la surface d'un aliment contaminé pour répondre aux besoins grandissants de sécurité alimentaire.

2.6.1 Papiers antimicrobiens pour le contrôle d'agents pathogènes

Alors qu'il existe de nombreux travaux publiés sur les emballages antimicrobiens qui maintiennent ou améliorent la qualité, la sécurité et la durée de conservation des aliments [169], les travaux de recherche sur des emballages bioactifs de contrôle et de désactivation de bactéries sont quasi-inexistants. Le seul emballage ayant des qualités bioactives est un emballage de biodiffusion (non commercialisé à ce jour) qui permet de résoudre le problème de résistance des additifs alimentaires bioactifs⁵⁶ aux contraintes de fabrication (blanchiment, pasteurisation et stérilisation) des aliments emballés. Les propriétés bioactives ne préviennent cependant pas des contaminations alimentaires, mais indiquent plutôt que les additifs seraient immobilisés à la surface de l'emballage alimentaire. L'immobilisation s'effectue par adsorption, liaison covalente, réticulation, emprisonnement ou encapsulation [170].

Les papiers antimicrobiens se retrouvent sous forme d'emballages antimicrobiens, de billets de banque antimicrobiens, de papier antimicrobien pour impression, de mouchoir antiviral et de papier essuie-main antibactérien. Les papiers antimicrobiens ne contiennent pas d'agents bioactifs tel que des enzymes, des anticorps, des aptamères ou des bactériophages, mais certains produits chimiques antimicrobiens soigneusement choisis : ils sont donc bioactifs sans être « biologiques ». Par exemple, le papier à billet de banque antimicrobien est à base de chlorhexidine, un antiseptique fort, dérivé du goudron, à large spectre antibactérien [171] qui permet d'inhiber efficacement la propagation de maladies infectieuses.

⁵⁶ Vitamines, prébiotiques ou phytochimiques qui font habituellement partie des ingrédients de la préparation des aliments.

Quant au papier antibactérien pour impression, des produits chimiques brevetés [172] protègent le papier de champignons, moisissures, et bactéries dommageables pour le papier. Le pli médian du mouchoir antiviral à trois plis de *Kimberley Clark* [173] est traité avec une formule antivirale chimique brevetée qui est activée par l'humidité nasale, l'éternuement ou la toux⁵⁷.

La littérature rapporte quatre méthodes de fabrication d'emballages antimicrobiens. La méthode habituelle de fabrication est le couchage à enduction qui consiste à appliquer au papier de base une couche antimicrobienne brevetée inhibant la croissance de champignons et de bactéries. L'inconvénient de cette méthode est que la couche peut être endommagée par une manipulation inadéquate. La deuxième méthode de fabrication consiste à broser les fibres du papier en différentes directions afin que l'arrangement des fibres crée un chemin tortueux qui empêcherait les microorganismes de passer à travers le papier. La troisième méthode de fabrication consiste à augmenter le pourcentage de liant qui remplit l'espace entre les fibres et rend le papier moins perméable aux microorganismes. Enfin, la quatrième méthode de fabrication consiste à mélanger en suspension libre l'agent antimicrobien au liant d'encollage du papier (latex, silicone, acrylique), rendant l'agent disponible dans des réservoirs et capable de migrer par les fibres adjacentes jusqu'à la surface du papier pour un traitement antimicrobien uniforme, au fur et à mesure de l'utilisation et la consommation du dépôt antimicrobien initial sur la surface [174]. L'additif antimicrobien est choisi selon sa compatibilité avec le liant pour qu'il réside en suspension colloïdale avec les zones amorphes du liant et non réticulé sur les zones amorphes du liant. Le deuxième avantage de taille de cette méthode est la réduction du coût associé au broyage du papier et l'augmentation du pourcentage de liant, en plus d'améliorer l'imprimabilité du papier, au besoin éventuel. Le troisième avantage de la méthode est que les propriétés antimicrobiennes du papier sont conservées même après les étapes d'égouttage, pressage, séchage et calandrage.

⁵⁷ Le papier permettrait de capturer en moins de 15 minutes, 99,99% des rhinovirus 1A et 2 provoquant le rhume, les virus influenza A et B provoquant la grippe et le virus respiratoire syncytial (VRS) causant l'infection des voies respiratoires chez l'enfant.

2.6.2 Papiers pour la détection d'agents pathogènes

Il existe des papiers pour la détection d'agents pathogènes, sommairement présentés ici, car leur objectif est la détection et non le contrôle des agents pathogènes. D'autres projets, dans le cadre du réseau Sentinel s'intéressent davantage à cette problématique. Notre papier bioactif à base d'enzymes (développé à la section 5.1) s'en rapproche quelque peu. Les papiers de détection sont essentiellement des bandelettes, nommément : pour séparation microfluidique, immunochromatographique, à base de liposomes, à base de sulfure d'hydrogène, enzymatiques et d'analyse urinaire.

Les bandelettes pour séparation microfluidique, développées dans le laboratoire de G.M. Whitesides à Harvard, permettent la détection colorimétrique de certaines molécules (glucose, protéines, par exemple) dans l'urine [175]. Les bandelettes immunochromatographiques, basées sur les interactions anticorps-antigènes (section 2.3.1) permettent de détecter des bactéries pathogènes. Elles ont l'avantage d'être rapides, avec une détection visualisée après 5 à 10 minutes [37, 176]. Les bandelettes à base de liposomes pourraient permettre la détection colorimétrique de bactéries pathogènes comme *E.coli* 0157:H7, [177] mais sont toujours au stade du laboratoire. Les bandelettes à base de sulfure d'hydrogène permettent la détection de contamination fécale dans de l'eau potable lors des catastrophes naturelles, par exemple lors du cyclone Ami dans les îles Fiji [178]. Les bandelettes enzymatiques ne contiennent pas d'enzymes, uniquement à base d'un chromogène tel que le PYR (L-Pyrrolidonyl- β -naphthylamide), elles reposent sur la détection de l'hydrolyse du chromogène PYR provoqué par l'enzyme bactérienne L-Pyrrolidonyl Peptidase [179]. Les bandelettes d'analyse urinaire constituent un exemple de biocapteur commercialisé avec succès jusqu'à devenir un classique pour la détection des signes de diabète ou d'inflammation du rein. Ces bandelettes peuvent aussi indiquer différentes substances, telles que des protéines, du glucose, des cétones, de la bilirubine, une hémorragie des muqueuses gastriques, une bactériurie ou de l'urobilinogène.

Cependant, dû au fait que les quantités (tonnages) qui peuvent être ainsi produites sont, de loin, inférieures aux produits d'emballages visés par notre travail, les méthodes de fabrication ne s'appliquent pas à des productions à grande échelle. De surcroît, les méthodes de transfert à grande échelle d'agents bioactifs sur support solide ne sont pas traitées dans la littérature. La littérature ne rapporte que des méthodes de fabrication à petite échelle : impression par lithographie [180], photolithographie [181, 182], électro pulvérisation [183], impression laser biologique BioLP^{MD} [184], impression jet d'encre [56, 185, 186], nano impression de précision [187], et microsystemes robotisés de dépôt de liquide pour fabriquer des biopuces ADN [188].

Chapitre 3 - Méthodologie de la recherche

Les matériels, les équipements et les méthodes qui sont utilisées pour atteindre l'objectif de ce travail de recherche (section 1.3) sont présentés.

3.1 Matériels

3.1.1 Pâte à papier

La pâte à papier est l'ingrédient de base pour la fabrication de papier bioactif. Les propriétés des fibres de cellulose qui composent la pâte à papier sont intimement liées aux propriétés des papiers de base. Les propriétés des papiers de base telles que la porosité sont influencées par les propriétés des fibres elles-mêmes ainsi que par la nature des liaisons entre les fibres. Dans l'objectif d'étudier l'influence de la porosité des papiers de base sur l'efficacité des papiers bioactifs à base de phages, une série de raffinage d'une pâte kraft blanchie de résineux du nord NBSK (illustrée à la Figure 3-1) a été réalisée pour fabriquer les papiers de base de différentes porosités contrôlées et présentée à la section 3.1.2.5.

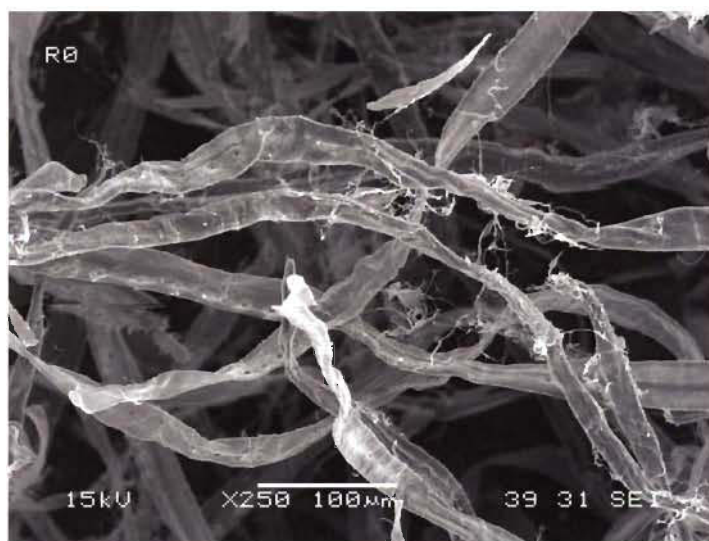


Figure 3-1 Pâte NBSK R₀ non raffinée

3.1.2 Papiers

Pour développer des papiers bioactifs, l'influence des propriétés physiques des papiers de base est analysée en utilisant, en premier temps, différents papiers commerciaux en feuilles et en rouleau. En deuxième temps, la propriété de porosité du papier de base est évaluée au moyen du raffinage de la pâte à papier utilisée (section 3.1.1) et la formation de feuilles de papiers de base en utilisant une « formette dynamique » (section 3.2.8).

La perméabilité à l'air du papier est la mesure indirecte de la porosité du papier, exprimée en $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ équivalent à l'instrument *Bendtsen*, qui sera mesurée avec l'instrument *Parker Print Surf*, selon la méthode ISO 5636-3. La rugosité *Bendtsen* du papier est la mesure de la rugosité du papier, exprimée en μm , qui sera mesurée avec l'instrument *Parker Print Surf*, selon la méthode ISO 8791-2. La *main* est le volume massique du papier calculé par rapport épaisseur grammage. Les mesures $L^*a^*b^*$ des papiers sont une mesure des coordonnées de couleur du papier à l'aide du spectrophotomètre Technidyne selon la méthode ISO 5631-1 décrite à la section 3.2.2.

3.1.2.1 Papiers non couchés en feuilles pour impression d'enzymes

Le papier de base pour LWC (papier couché léger ou *Light Weight Coated*) est composé de 70 % de pâte TMP (pâte thermomécanique) et de 30% de pâte kraft blanchie. La pâte TMP, contrairement à la pâte chimique, contient encore la lignine. Elle possède ainsi une plus grande compressibilité, qualité recherchée pour une impression héliogravure : le papier va puiser l'encre plus profondément dans l'alvéole du cylindre gravé. Le Tableau 3-1 présente quelques caractéristiques physiques et optiques du papier de base pour LWC.

Tableau 3-1 Propriétés physiques et optiques du papier non couché en feuilles

Grammage $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$	Épaisseur μm	Main $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	Perméabilité à l'air $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
35,5	49	1,34	261 ± 21
Rugosité Bendtsen μm (pression 980 kPa, tête molle)			
$5 \pm 0,2$			
L^* $81,54 \pm 0,11$	a^* $-1,11 \pm 0,01$		b^* $2,10 \pm 0,04$

3.1.2.2 Papier couché LWC en feuilles pour impression d'enzymes et de phages

Les papiers LWC sont des papiers de faible grammage (inférieur à 80 g.m^{-2}) ayant subi un traitement de surface par couchage ou pigmentation. Le poids de la couche est généralement faible, compris entre 5 et 10 g.m^{-2} par face. Les papiers LWC sont typiquement utilisés pour imprimer des magazines ou des catalogues de vente par correspondance, en offset ou en héliogravure.

Nous utilisons un papier LWC (Tableau 3-2) qui a été produit au CIC (Centre International du Couchage) à partir d'un papier de base pour LWC (Tableau 3-1) auquel une couche composée de pigments (carbonate de calcium 65%, kaolin du Brésil 35%) et de liants (latex 10 parts, amidon 6 parts) a été appliquée. La masse de couche appliquée est de $8,1 \text{ g.m}^{-2}$ par face.

Tableau 3-2 Propriétés physiques et optiques du papier couché LWC en feuilles

Grammage g.m^{-2}	Épaisseur μm	Main $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	Perméabilité à l'air mL.min^{-1}
51,6	48	0,93	5 ± 2
Rugosité Bendtsen μm (pression 980 kPa, tête molle)			
$1,6 \pm 0,1$			
L*	a*		b*
$87,18 \pm 0,08$	$-1,21 \pm 0,01$		$1,62 \pm 0,04$

3.1.2.3 Papier non couché au sulfite pour impression d'enzymes

Un papier non couché au sulfite est utilisé dans ce travail pour évaluer si l'acidité du papier au sulfite pouvait avoir une influence sur la bioactivité de l'enzyme. Le papier utilisé est composé exclusivement de fibres issues d'une pâte bisulfite. Le Tableau 3-3 présente quelques caractéristiques physiques et optiques du papier au sulfite utilisé.

Tableau 3-3 Propriétés physiques et optiques du papier non couché au sulfite

Grammage g.m ⁻²	Épaisseur μm	Main cm ³ .g ⁻¹	Perméabilité à l'air mL.min ⁻¹
47,4	70	1,48	449 ± 24
Rugosité Bendtsen μm (pression 980 kPa, tête molle)			
5,75 ± 0,1			
L*	a*		b*
63,60 ± 0,17	3,66 ± 0,05		18,07 ± 0,08

3.1.2.4 Papier non couché en rouleau pour couchage de phages

Un rouleau de papier non couché est utilisé pour le couchage à lame de sauce de couchage à base de phages avec la coucheuse CLC-7000. Le papier utilisé est composé exclusivement de fibres issues d'une pâte mécanique de résineux. Le Tableau 3-4 présente quelques caractéristiques physiques du papier non couché utilisé.

Tableau 3-4 Propriétés physiques du papier non couché en rouleau

Grammage g.m ⁻²	Épaisseur μm	Main cm ³ .g ⁻¹	Perméabilité à l'air mL.min ⁻¹
47	65	1,38	341 ± 30
Rugosité Bendtsen μm (pression 980 kPa, tête molle)			
5,5 ± 0,1			

3.1.2.5 Papiers non couchés à porosité contrôlée pour impression de phages

Des papiers à porosité contrôlée ont été fabriqués pour étudier l'influence de la porosité des papiers de base sur l'efficacité des papiers bioactifs à base de phages. La porosité du papier est modifiée au moyen d'un raffinage contrôlé, à l'aide d'un raffineur à pile Valley (section 3.2.7) et de la pâte à papier servant à fabriquer le papier. Le raffinage d'une suspension aqueuse de fibres est un traitement mécanique entre les lames d'un cylindre de raffinage, qui permet de presser la paroi des fibres et de désintégrer partiellement leur surface. Le cisaillement des fibres sépare une partie des fibrilles.

La surface des fibres devient plus peluchée, les fibres deviennent plus gonflées et plus flexibles. Ces modifications sont responsables de la modification de la porosité du papier fabriqué. Par ailleurs, l'état d'hydratation et le comportement de filtration des fibres sont affectés par le raffinage de la suspension fibreuse : des fibres compactes et non gonflées s'écoulent plus « librement » que des fibres gonflées et défibrillées. Le développement des fibrillations des fibres réduit la capacité de drainage de la pâte et résulte ainsi à une plus faible valeur d'indice d'égouttage. L'indice d'égouttage en mL ou °CSF (*Canadian Standard Freeness*) des suspensions fibreuses diluées utilisées est une quantification indirecte du degré de raffinage des fibres, selon la norme TAPPI T227 et ISO 5267/2.

La pâte NBSK R₀ de départ (non raffinée) a été précédemment illustrée à la Figure 3-1. L'indice d'égouttage CSF 670 mL de cette pâte mène à la formation de feuilles ayant une structure physique très ouverte, *i.e.* des feuilles de papier très poreuses, ayant 5630 mL.min⁻¹ de perméabilité à l'air.

La Figure 3-2 illustre la pâte R₁ obtenue après 15 min de raffinage de la pâte R₀. L'indice d'égouttage CSF 620 mL de la pâte R₁ aboutit à la formation de feuilles d'environ 840 mL.min⁻¹ de perméabilité à l'air. La Figure 3-2 illustre le développement des fibrillations à la surface des fibres, le gonflement des fibres et l'augmentation de leur flexibilité, des effets responsables de la baisse de la perméabilité à l'air du papier formé, de 5630 mL.min⁻¹ à 840 mL.min⁻¹, en seulement 15 min de raffinage.



Figure 3-2 Pâte NBSK R₁ raffinée 15 min – CSF 620 mL

La Figure 3-3 montre la pâte R₂ obtenue après 30 min de raffinage de la pâte R₀. L'indice d'égouttage CSF 550 mL de la pâte R₂ permet de former des feuilles d'environ 250 mL.min⁻¹ de perméabilité à l'air. La consommation énergétique additionnelle de 15 min de raffinage supplémentaire permet de réduire davantage la perméabilité à l'air du papier formé de 840 mL.min⁻¹ à 250 mL.min⁻¹, *i.e.* un papier dont la structure physique est significativement plus fermée.

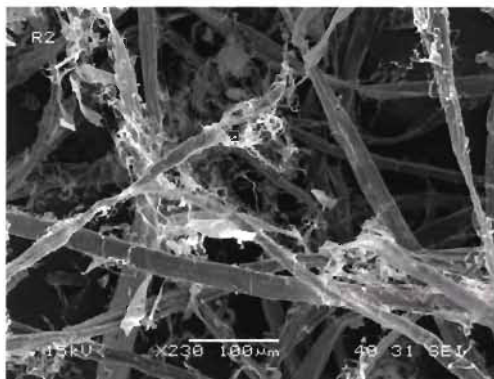


Figure 3-3 Pâte NBSK R₂ raffinée 30 min – CSF 550 mL

La Figure 3-4 illustre la pâte R₃ obtenue après 45 min de raffinage de la pâte R₀. L'indice d'égouttage CSF 500 mL de la pâte R₃ permet de former des feuilles d'environ 130 mL.min⁻¹ de perméabilité à l'air. La consommation énergétique additionnelle de 15 min de raffinage supplémentaire permet de réduire encore davantage la perméabilité à l'air du papier formé de 250 mL.min⁻¹ à 130 mL.min⁻¹.



Figure 3-4 Pâte NBSK R₃ raffinée 45 min – CSF 500 mL

La Figure 3-5 illustre la pâte R₄ obtenue après 60 min de raffinage de la pâte R₀. L'indice d'égouttage CSF 450 mL de la pâte R₄ permet de former des feuilles d'environ 10 mL.min⁻¹ de perméabilité à l'air. La consommation énergétique additionnelle de 15 min de raffinage supplémentaire permet de fermer davantage la structure physique du papier, et réduire davantage la perméabilité à l'air du papier formé de 130 mL.min⁻¹ à 10 mL.min⁻¹.

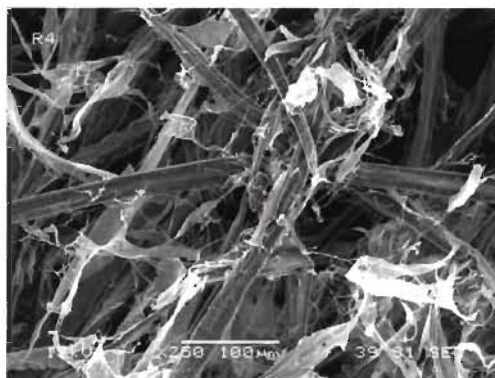


Figure 3-5 Pâte NBSK R₄ raffinée 60 min – CSF 450 mL

Les feuilles de papier sont ensuite fabriquées au moyen d'une « formette dynamique » décrite à la section 3.2.8, en suivant le protocole décrit à l'Annexe 1. Le Tableau 3-5 illustre les propriétés physiques des cinq papiers formés à partir de la pâte NBSK dont la durée de raffinage a varié entre 15 min et 60 min pour obtenir des pâtes à indice d'égouttage variant entre 620 mL et 450 mL. Les pâtes obtenues permettent la formation de 5 papiers ayant des perméabilités à l'air variant entre 5635 mL.min⁻¹ et 11 mL.min⁻¹.

Tableau 3-5 Propriétés physiques des papiers non couchés à porosité contrôlée

Papier	Durée de raffinage min	CSF mL	Grammage g.m ⁻²	Densité g.cm ⁻³	Rugosité Bendtsen (pression 980 kPa, tête molle) μm	Perméabilité à l'air mL.min ⁻¹
R ₀	0	670	90	0,49	10	5635
R ₁	15	620	90	0,54	11	845
R ₂	30	550	90	0,58	11	247
R ₃	45	500	90	0,60	11	134
R ₄	60	450	90	0,69	11	11

3.1.3 Enzyme peroxydase de raifort

Les enzymes HRP, décrites à la section 2.3.3.1, sont utilisées pour la détection de peroxyde d'hydrogène. L'enzyme HRP utilisée a un poids moléculaire de 44 kDa. L'enzyme HRP est stable à des températures allant jusqu'à 60°C. L'activité de l'enzyme HRP est optimale dans des solutions aqueuses de pH 6,9.

3.1.4 ABTS

L'acide 2,2'-Azino-bis 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (ABTS) est le chromogène utilisé (Figure 3-6) et imprimé sur papier simultanément avec l'enzyme HRP pour fabriquer un papier bioactif pour détecter la présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le chromogène jouant le rôle de substrat et de transducteur optique est transformé au cours de la réaction catalysée par l'enzyme HRP pour signaler la présence de peroxyde d'hydrogène : l'ABTS, considéré comme un donneur d'hydrogène, est oxydé en présence de peroxyde d'hydrogène et la forme oxydée du colorant ABTS confère au papier bioactif une teinte verte quasi instantanée et visible à l'œil nu – et mesurable – lorsqu'une quantité de peroxyde d'hydrogène est détectée. L'efficacité du biocapteur n'est pas optimale, mais sa simplicité permet de corréler le signal optique du transducteur à l'intégrité des enzymes HRP après transfert sur le papier.

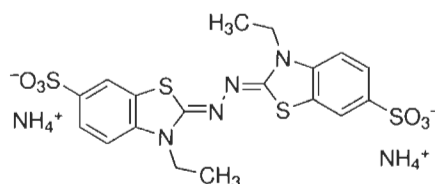


Figure 3-6 Acide 2,2'-Azino-bis 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (ABTS)

3.1.5 Carboxyméthylcellulose

L'étude de l'impact de différents modificateurs de viscosité sur l'activité de l'enzyme HRP a montré que plusieurs polymères détériorent l'activité de l'enzyme sauf le carboxyméthylcellulose (CMC) qui permet d'obtenir la viscosité désirée en réduisant le moins l'activité de l'enzyme [56]. Nous utiliserons le polymère CMC d'environ 66 kg.mol⁻¹ de poids moléculaire comme modificateur de viscosité.

3.1.6 Bactériophage T4

Les bactériophages T4, décrits à la section 2.3.4.1, sont utilisés pour la fabrication de papier bioactif visant le contrôle de bactéries *E.coli*. Les phages T4 utilisés sont naturels, non modifiés génétiquement, isolés d'eau d'égout et fournis par le laboratoire de microbiologie de l'UQTR. L'unité de formation de plages (ufp) est l'unité de quantification des solutions à base de phages correspondant au nombre d'unités (nombre de phages) formant une plage de lyse. Le stock initial de phages T4 utilisé est de 10^8 ufp.mL⁻¹.

3.1.7 Escherichia Coli

La bactérie non pathogène *Escherichia coli* B est la bactérie que doit contrôler le papier bioactif à base de phages. La bactérie a été choisie comme modèle expérimental, car nos équipements de laboratoire en microbiologie ne sont pas du niveau de confinement 2 qui nous aurait permis d'utiliser des bactéries pathogènes.

Notons que bien que les souches *E.coli* B soient non pathogènes, celles-ci n'en sont pas moins une indication de contamination fécale de l'eau ou de l'aliment. De plus, ce choix n'affecte en rien l'étude présente, car les résultats seront directement applicables au cas des bactéries pathogènes dû à l'universalité du mécanisme de lyse et de la structure de base des phages lytiques.

L'inoculum de la bactérie hôte utilisé est obtenu après 18h de culture à 37°C de la bactérie *E.coli* dans 3 mL de bouillon de TSB (« *Tryptic Soy Broth* » ou bouillon trypticase de soja).

3.1.8 PolyDADMAC

Le polymère polyélectrolyte cationique PolyDADMAC (diallyl-diméthyl-ammonium-chloride, masse moléculaire de 600 kDa, Figure 3-7) est utilisé afin d'étudier l'influence de la nature d'immobilisation des phages à la surface du papier (section 4.2.7).

Les solutions aqueuses de PolyDADMAC ont été préparées en dissolvant le fixatif cationique ALCOFIX® 111 fourni par Ciba® dans de l'eau déminéralisée pendant 20 minutes sous agitation magnétique.

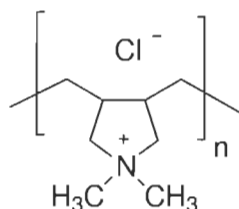


Figure 3-7 Poly(diallyl-diméthyl-ammonium-chloride)

3.1.9 Gélatine

De la gélatine *Fisher Scientific* type-A est utilisée en solutions contenant jusqu'à 10% en poids. Le point de gélification d'une solution de gélatine à 1% est de 20°C. La viscosité de la solution de gélatine à 5% est de 1000 mPa.s à 27,5°C et 1700 mPa.s à 25°C et devient instable en dessous de 25°C. Le point de gélification d'une solution de gélatine à 10% est de 30°C.

Au-delà de la température de gélification, les viscosités Brookfield des solutions à base de gélatine varient entre 5 mPa.s et 40 mPa.s, comme illustré à la Figure 3-8.

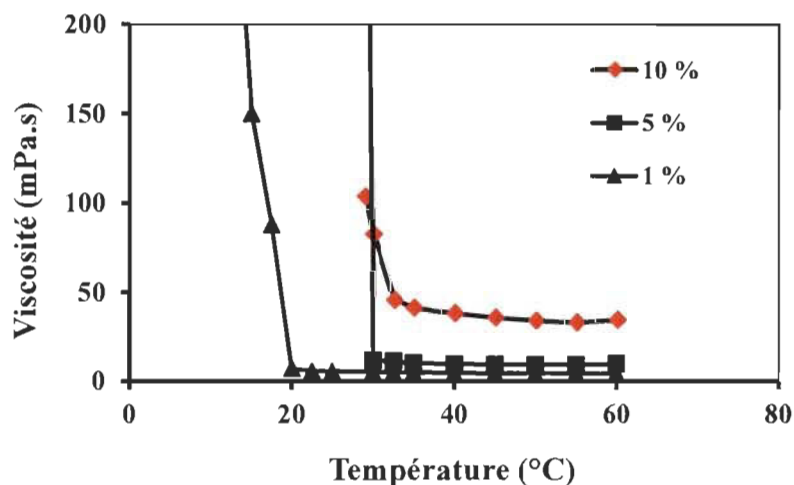


Figure 3-8 Point de gélification et viscosité des sauces de couchage bioactives

L'utilisation de la gélatine dans ce travail est liée à ses propriétés physico-chimiques.

3.2 Équipements

Les procédés de fabrication et les équipements sont sélectionnés en fonction des forces et de l'énergie transférées aux agents bioactifs qui peuvent ou non les dégrader. Le taux de cisaillement subi lors des procédés d'impression et de couchage par contact est d'environ 10^6 s^{-1} . En couchage à lame, le cisaillement est causé par la lame docteur qui racle l'excédent de solution bioactive. La contrainte de cisaillement peut être problématique et préjudiciable à la résistance des agents bioactifs lors de la fabrication du papier bioactif. Il n'existe aucune étude publiée à notre connaissance sur la résistance des agents bioactifs aux contraintes de cisaillement rencontrées lors des procédés potentiels de fabrication de papier bioactif. L'une des manières de réduire l'impact du cisaillement est d'utiliser une méthode de fabrication sans contact.

L'impression jet d'encre et le couchage rideau sont des procédés qui font subir un minimum de contraintes de cisaillement aux agents bioactifs.

Le procédé d'impression jet d'encre présente les avantages d'une absence d'un support intermédiaire pour le transfert d'encre, l'exactitude de la quantité d'agents bioactifs transférée ou la possibilité d'inclure plusieurs gouttelettes dans un seul pixel.

En contrepartie, l'impression jet d'encre est une méthode lente et coûteuse, particulièrement lorsqu'un ensemble de buses sur la largeur de la feuille est utilisé pour augmenter la productivité du procédé [189]. Le procédé de couchage rideau est une autre méthode de fabrication sans contact qui consiste en une tête de couchage qui transforme la sauce de couchage d'un réservoir en un mince film liquide, appelé rideau, qui tombe sous l'effet de la gravité jusqu'à ce qu'il entre en contact avec le papier de base convoyé en dessous du rideau. Les avantages du couchage rideau pour la fabrication de papier bioactif seraient une excellente qualité grâce à une épaisseur de film constante par couchage de contour, la possibilité d'appliquer simultanément plusieurs fines couches de moins d'un micron d'épaisseur, les faibles pressions du fluide au point d'application et les absences de trainées de racle.

Le couchage rideau permet d'obtenir une grande productivité, en fonction de vitesses de couchage atteignant 1800 m.min^{-1} , de faibles ruptures de feuille sur machine avec un faible coût dû au rendement élevé de la sauce bioactive grâce à l'absence de recirculation [190, 191].

L'écoulement laminaire et le contrôle individuel de la viscosité de chaque couche, l'absence de mélange par convection entre les couches adjacentes [192] et le prédosage séparé de chaque couche sont d'autres avantages qui ne nécessitent pas de système complexe de recirculation de fluide générant un entrainement d'air, des croûtes et de la mousse qui permettent une grande flexibilité de formulation et qui empêchent les pertes d'agents bioactifs lors d'arrêts de production. Le couchage rideau n'est toutefois pas exempt de défis : la fenêtre d'opération du procédé est limitée par la stabilité du rideau, l'entrainement d'air causé par la vitesse du papier et le rebondissement du fluide sur le papier peuvent causer une dégradation du mélange [193]. La faisabilité de l'utilisation du couchage rideau pour l'immobilisation de biomolécules a déjà été démontrée [194] avec des virus [195], des enzymes [196] ou des polymères antimicrobiens [197].

L'étude de la performance du procédé de couchage rideau pour la fabrication de papier bioactif n'a pas été considérée ici à cause de l'absence de l'équipement, et du coût d'achat, de location ou de développement en interne. À cause de l'intérêt du couchage rideau, une étude de faisabilité technicoéconomique de développement d'une tête de couchage rideau spécialement conçue pour la coucheuse de laboratoire CLC-7000 (section 3.2.6) a néanmoins été réalisée [198] dans l'objectif de mener des travaux de recherche au stade de laboratoire. L'étude a débouché sur trois options : a) l'achat d'une unité complète de couchage rideau du manufacturier *Polytype* qui reviendrait à un coût minimal de 120 000\$; b) la location de l'équipement qui reviendrait à 5000\$ par jour, et finalement c) le développement en interne qui nécessiterait une courbe d'apprentissage des aspects fondamentaux du procédé et des fenêtres d'opération pour obtenir une performance adéquate, particulièrement au niveau de l'épaisseur, de l'uniformité du film et de la robustesse aux perturbations ambiantes [192] qui sont influencées par les propriétés physiques du fluide, les conditions d'opération et la géométrie de l'équipement et du procédé.

En définitive, nous utiliserons les procédés d'impression gravure et de couchage à lame, malgré le taux de cisaillement subi par les agents bioactifs, pour le potentiel intéressant de transfert technologique des résultats à une échelle industrielle.

3.2.1 Presse d'impression de laboratoire IGT

La presse de laboratoire Global Standard Tester 2 de la marque IGT d'Innofibre, Centre d'innovation des produits cellulosiques du Cégep de Trois-Rivières, est utilisée pour imprimer les papiers. L'appareil IGT fonctionne à une vitesse d'impression de 0,2 à 4 m.s⁻¹ et à une force d'impression de 100 N à 1000 N. L'appareil est équipé de deux axes de rouleau d'impression et d'un système de lame docteur ou racle pour le dosage d'encre avant son transfert sur le papier.

Tel qu'illustré à la Figure 3-9, le secteur d'impression est recouvert d'une bande de caoutchouc compressible sur laquelle on fixe le papier à imprimer. La racle permet de doser la quantité d'encre dans les alvéoles de la molette gravée.

Nous nous sommes servis de la molette référencée 402.151.412 ; d'une lignature (nombre d'alvéoles par unité de longueur) de 40 L.cm⁻¹, avec un angle de gravure de 53°. La molette possède 4 zones d'impression de différentes profondeurs d'alvéoles, soit 65, 70, 75 et 80 microns. Les volumes d'alvéoles associés sont respectivement : 14, 17, 20 et 25 mL.m⁻².



Figure 3-9 IGT Global Standard Tester 2

L'impression est réalisée en atmosphère conditionnée à 50% d'humidité relative et 23°C selon la méthode normalisée TAPPI T402sp-03.

3.2.2 Spectrophotomètre Technidyne Colour Touch PC

Le spectrophotomètre Technidyne Colour Touch PC est utilisé pour comparer les différentes couleurs obtenues lors de la révélation de papiers bioactifs à base d'enzymes. Nous utilisons le modèle de mesure de couleurs CIE $L^*a^*b^*$ développé en 1976 par la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE).

La composante L^* est la luminance qui va de 0 (noir) à 100% (blanc) ; la composante a^* représente la gamme de l'axe rouge (127) à vert (-128) en passant par le blanc lorsque la luminance vaut 100% ; et la composante b^* représente la gamme de l'axe jaune (127) à bleu (-128) en passant par le blanc lorsque la luminance vaut 100%.

La mesure du système CIE 1976 $L^*a^*b^*$ est directement basée sur le diagramme CIE XYZ et vise à uniformiser la perception des différences de couleurs. Les relations non-linéaires pour L^* , a^* et b^* représentent et imitent autant que possible la réponse logarithmique de vision de l'œil.

Le ΔE (delta E) est l'indice qui permet de comparer quantitativement la différence de couleur entre un papier non imprimé et un papier imprimé, selon l'équation (1). Pour un œil humain normal, *i.e.* correspondant à l'observateur moyen, les différences de couleur sont perceptibles à partir de $\Delta E \geq 3$, ce qui donne une idée qualitative sur la sensibilité de la détection à l'œil nu des papiers imprimés.

$$\Delta E^* = \sqrt{((L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2)} \quad (1)$$

3.2.3 Microscope stéréoscopique Nikon SMZ800

Le microscope stéréoscopique Nikon SMZ800 d'Innofibre du Cégep de Trois-Rivières a été utilisé pour l'agrandissement des échantillons de papier bioactif. Le microscope permet d'obtenir des images de qualité, de manière productive et reproductible. L'acquisition d'image est réalisée avec un appareil photo numérique raccordé au microscope grâce à un séparateur de faisceau et un adaptateur.

La performance du microscope pour l'observation de papiers bioactifs provient de l'éclairage épiscopique oblique permettant d'éclairer les échantillons opaques par le dessus, avec une grande variété d'orientations de la lumière qui a pour effet d'exposer au mieux les aspects et les caractéristiques de la zone de lyse observée autour des papiers bioactifs (section 4.2). Il a été constaté que les caractéristiques de la zone de lyse sont mieux révélées par combinaison de lumière transmise et de lumière réfléchie de toute la surface de l'échantillon. L'agrandissement du microscope s'est avéré particulièrement adapté aux disques de 6 mm. Le facteur de zoom de 6,3:1 du système optique parallèle du SMZ800 n'est cependant pas exploitable pour l'observation de la bioactivité des disques de 2,54 cm de diamètre, qui nécessitent plutôt un montage d'agrandissement «maison» à l'aide d'un trépied, d'un appareil photo numérique, et d'un éclairage annexe.

3.2.4 Adobe Photoshop CS3

Le logiciel Adobe Photoshop CS3 a été choisi pour le traitement d'image des zones de lyse des papiers bioactifs. La fonction *sélection rapide* est particulièrement intéressante pour sélectionner de nombreux échantillons de manière semi-automatique. Le deuxième atout du logiciel est le calcul automatique de l'aire de la zone de lyse, ainsi que l'exportation groupée et automatique des différentes caractérisations d'échantillons.

3.2.5 Équipements microbiologiques

Nous avons utilisé divers équipements microbiologiques du laboratoire de la chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie du professeur Simon Barnabé de l'UQTR, tels qu'un incubateur, un autoclave, une hôte microbiologique, un bain-marie, des boîtes de Petri, tubes, pipettes, et outils d'étalement stériles.

3.2.6 Coucheuse de laboratoire CLC-7000

La coucheuse de laboratoire de dernière génération CLC-7000 (*Cylindrical Laboratory Coater*) d'Innofibre du Cégep de Trois-Rivières, pouvant opérer en couchage à lame, à baguette ou à faible temps de séjour (short-dwell), est une machine de laboratoire qui permet de traiter la surface du papier (couchage) à une vitesse de 2200 m.min⁻¹. L'équipement dispose de 36 lampes infrarouges de séchage d'une puissance contrôlable.



Figure 3-10 Coucheuse de Laboratoire CLC-7000

3.2.7 Raffineur de laboratoire Type Valley

Le raffineur type « Valley » ou à pile Valley d’Innofibre du Cégep de Trois-Rivières est utilisé pour le raffinage de la pâte à papier utilisée pour fabriquer les papiers de base à porosité contrôlée décrits à la section 3.1.2.5.

Avant l’utilisation du raffineur, une quantité de 360g secs de pâte est déchirée en morceaux de forme carrée, mise en suspension puis désintégrée avec un désintégrateur. La pile Valley (Figure 3-11) est remplie de la suspension de 360g secs de pâte dans un volume de 23 litres d’eau. Le raffineur est démarré sans poids pendant 3 minutes, puis un poids de 5,5 kg est attaché au levier et le raffinage démarre. Les pâtes sont ensuite prélevées après une durée de raffinage variant de 0 à 60 minutes.



Figure 3-11 Raffineur de laboratoire Type Valley

3.2.8 Formette dynamique

L'étape unitaire de formation d'une feuille sur une machine à papier commence par la caisse de tête qui est l'élément principal de distribution de la suspension fibreuse sur le(s) support(s) filtrant(s) de l'unité de formation de la machine à papier. Les cinq principales fonctions de la caisse de tête sont 1) transformer l'écoulement à symétrie cylindrique en écoulement plan, uniforme, sur le sens travers ; 2) amortir les pulsations de pression/débit, les variations de concentration de la pâte à l'entrée ; 3) défloculer la suspension fibreuse en générant une turbulence d'échelles et d'intensité maîtrisées ; 4) régler le jet formé en maîtrisant : épaisseur, module et direction du vecteur vitesse, degré de turbulence, concentration ; et 5) assurer un réglage des profils sens travers de grammage et d'orientation fibreuse [199].

Au laboratoire, des feuilles d'environ 160 mm de diamètre peuvent être fabriquées avec une formette conventionnelle selon les normes papetières ISO 5269/1 - TAPPI T205 - SCAN C26 et PAPTAC C4. Alors que cette méthode est simple et rapide, la structure physique de la feuille formée est trop différente, de par l'orientation anisotrope (fibres orientées aléatoirement) des fibres surtout, à celle d'une feuille sortie d'une machine à papier, notamment en ce qui concerne la porosité de la feuille. Nous l'avons donc exclue de notre étude.

La formette dynamique illustrée à la Figure 3-12 est un équipement permettant la formation d'une feuille de papier rectangulaire de 250 mm x 970 mm, avec un grammage variant entre 10 et 400 g.m⁻², de manière comparable à la formation d'une feuille isotrope sur machine à papier. La formette dynamique recircule la suspension fibreuse pour tenter de la défloculer. La buse de pulvérisation de la suspension fibreuse simule la buse terminale de la caisse de tête appelée « bec de perroquet » et permet de contrôler l'épaisseur, le module et la direction du vecteur de la vitesse de jet, et assure un réglage des profils sens travers de grammage de la feuille et d'orientation fibreuse. La formette dynamique utilisée permet d'obtenir un ratio d'orientation de fibres sens travers/machine ST/SM de 0,2 à 0,9 [200]. Le protocole d'utilisation de la formette dynamique se trouve dans l'Annexe 1.

La formette dynamique est utilisée pour la formation de feuilles de papier de différentes porosités (Annexe 1) dans l'objectif d'obtenir les résultats de la section 5.9. La formette dynamique peut aussi être utilisée pour fabriquer des feuilles de papier incorporant des phages dans la structure poreuse du papier (Travaux futurs, section 6.2).



Figure 3-12 Formette dynamique

3.3 Méthodes

3.3.1 Formulation d'une bioencre à base d'enzymes

La méthode expérimentale développée pour la fabrication d'un premier papier bioactif à base d'enzymes pour la détection de peroxyde de peroxyde d'hydrogène nous a permis d'appréhender les aspects préliminaires de développement d'un papier bioactif. La méthode a essentiellement nécessité la formulation d'une première bioencre à base d'enzymes. Telle une encre traditionnelle, la bioencre est composée de matières actives, *i.e.* une enzyme et un chromogène, équivalentes aux pigments d'une encre colorée. Un véhicule (liquide) est utilisé pour transporter la matière active sur le support papier et le type de véhicule détermine le mode de séchage de l'encre et les caractéristiques de résistance et d'adhésion. Des additifs peuvent être utilisés pour optimiser les caractéristiques de l'encre pendant et après impression, mais ceux-ci ne seront pas utilisés, car notre optimisation de papier bioactif concerne le contrôle de bactéries.

La formulation de bioencre à base d'enzymes que nous avons développée est adaptée au procédé d'impression par gravure. La viscosité utilisée est de 50 mPa.s afin d'optimiser la quantité de transfert d'encre par impression gravure.

La bioencre est composée de l'enzyme peroxydase de raifort à $254 \text{ U}^{58}.\text{mg}^{-1}$ d'activité (1 mg.mL^{-1}), du chromogène ABTS à $18,2 \text{ mM}$ ($18,2 \text{ mol.L}^{-1}$) et du CMC comme modificateur de viscosité en solution tampon (pH 6,8) de phosphate de potassium.

L'activité de toute enzyme est optimale à l'intérieur d'une petite plage de pH, car le pH modifie les liens intra- et intermoléculaires de la molécule d'enzyme et ainsi la forme de l'enzyme, et par voie de conséquence l'efficacité de l'enzyme. Le pH affecte aussi les charges sur les acides aminés incluant ceux des sites actifs. L'activité de l'enzyme HRP est optimale à pH 6,5. Un pH de 6,8 a été choisi de manière à se situer dans la zone de forte activité de l'enzyme. Par ailleurs, le point isoélectrique (pH auquel la biomolécule est globalement électriquement neutre) de l'enzyme HRP utilisé est de 7,2. Au-delà, l'enzyme est chargée négativement, en deçà elle est plutôt positive. À pH 6,8, l'enzyme HRP est légèrement chargée positivement, tandis que les fibres de cellulose sont chargées négativement.

3.3.2 Formulation d'une bioencre à base de phages

La méthode concerne la fabrication d'un papier bioactif pour le contrôle de bactéries et est directement reliée à l'objectif principal de la thèse (section 1.3). Nous décrivons ici essentiellement la formulation de bioencre à base de phages. La formulation de la bioencre dépend de la méthode utilisée pour le transfert de bioencre. Pour être utilisée en impression héliogravure (section 3.3.3), la bioencre à base de phages est composée d'un mélange d'une solution de phages T4 à $10^7 \text{ phages.mL}^{-1}$ et d'une solution de CMC à 1% de concentration afin d'obtenir une bioencre de 50 mPa.s de viscosité Brookfield [201].

3.3.3 Impression gravure d'enzymes et de phages

L'impression gravure est un procédé intaglio caractérisé par des éléments d'image, ou alvéoles, gravés en surface du cylindre. Les alvéoles sont situées à un niveau inférieur, donc en creux, par rapport aux zones sans image à la surface du cylindre.

⁵⁸ Unité enzymatique : Quantité de substrat transformée (en μmoles) par unité de temps (minute).

L'impression gravure de biomolécules a déjà été utilisée dans l'impression d'indicateurs colorimétriques sur des emballages intelligents pour la surveillance de maturation d'aliments [202]. L'impression gravure permet d'obtenir une grande qualité d'impression [189], cependant ce procédé d'impression n'est approprié que pour les longs tirages (supérieurs à 500 000) à cause des coûts très élevés de fabrication des cylindres d'impression [189] : ce qui ne sera pas le cas des papiers bioactifs vu que l'image imprimée est l'ensemble de la surface du papier ou une zone qui ne change pas d'un tirage à un autre.

La méthode d'impression consiste à submerger le cylindre gravé entièrement d'encre, puis l'encre présente dans la zone sans image est enlevée au moyen d'une racle (lame métallique), de sorte que l'encre demeure uniquement dans les alvéoles. Ensuite, l'encre est transférée des alvéoles au papier par une grande pression et par les différentes forces d'adhésion entre le papier et l'encre (Figure 3-13, [189]).

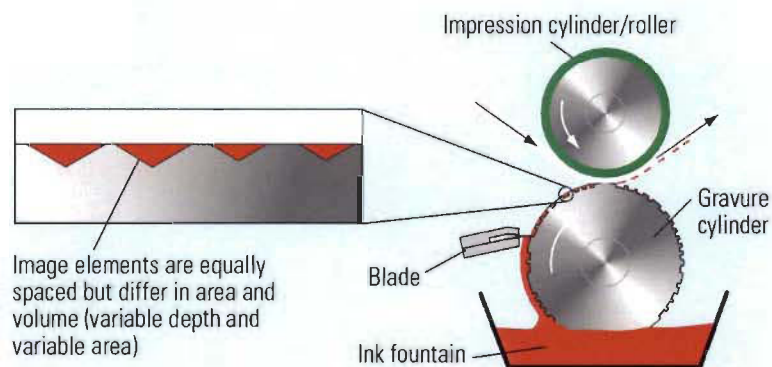


Figure 3-13 Représentation schématique de l'impression gravure

La méthode suivie pour l'impression gravure de papier bioactif est celle préconisée par le fournisseur (IGT) pour une impression avec une molette gravée. Il s'agit de la méthode « gravure 180° ». L'impression se fait sur des bandelettes de papier LWC (papier couché léger) adapté à l'impression gravure, d'un grammage de 60 g.m⁻², d'un poids de couche de 8 g.m⁻² et mesurant 50x300 mm², en utilisant la presse de laboratoire IGT (Figure 3-9, section 3.2.1) avec le procédé d'impression gravure à des vitesses de 0,2 à 4 m.s⁻¹ et à des forces d'impression de 100 à 1000 N.

Le cylindre d'impression utilisé est un anilox IGT 402.123 à pellicule de photopolymère, d'un lignage de trame de 40 l.cm^{-1} avec 4 zones d'impression ayant 15, 35, 65 et 85% de couverture. L'impression et le séchage des papiers sont menés en atmosphère contrôlée à 50% d'humidité relative et 23°C selon la norme TAPPI T402 sp-03. Le papier choisi est un papier couché léger à pâte mécanique, car il permet le meilleur taux de transfert par impression gravure.

Considérant que les alvéoles se vident au maximum à 80% du volume total, le volume d'encre transféré est de 16 mL.m^{-2} à 20 mL.m^{-2} selon la profondeur des alvéoles. Les densités d'enzyme immobilisée est de 364 et 455 nmol.m^{-2} respectivement, en utilisant la formulation de la bio-encre décrite à la section 3.3.2.

3.3.4 Formulation d'une sauce de couchage à base de phages

Dans le cas de l'utilisation du couchage à lame (section 3.3.5), la sauce de couchage à base de phages est composée d'un mélange de solutions de phages T4 et de CMC. Deux sauces de couchage différentes ont été préparées. Une première sauce de couchage d'une viscosité (Brookfield) de 250 mPa.s est préparée avec des phages de 10^7 ufp.mL^{-1} , 5% en masse de gélatine, et 3% en masse de CMC. Une deuxième sauce de couchage est préparée similairement, mais avec 5% en masse de CMC, résultant en une viscosité de 250 mPa.s.

3.3.5 Couchage à lame de phages

Le couchage de papier a pour but d'en rendre la surface régulière, lisse et uniforme [203]. La plupart des papiers couchés sont destinés à l'impression. D'autres papiers de spécialité comprennent une couche fonctionnelle, tels que le papier autocopiant, le papier ingraissable pour emballages alimentaires, le papier siliconé pour étiquettes autocollantes, le papier thermique, le papier ignifuge, le papier hydrofuge, le papier antidérapant et le papier photographique [204].

Le papier bioactif peut aussi être considéré comme un « papier fonctionnel de spécialité », cependant, seules de rares études [59] ont été publiées sur le couchage d'agents bioactifs (enzymes) sur le papier à l'égard des travaux [201, 205-208] réalisés dans cette thèse sur le couchage d'agents bioactifs (phages) sur le papier. De manière générale, le couchage consiste à appliquer une sauce au papier dans une station d'application ou de transfert, puis à sécher le papier afin d'évaporer l'excédent d'eau et fixer les liants. La station de couchage peut être incorporée en ligne à la machine à papier, ou installée hors ligne en proximité [203]. Le taux de solides de la sauce de couchage est le plus haut possible afin de réduire l'énergie de séchage et ne pas trop mouiller le papier ; il est toutefois fonction du type de papier, de 50 à 70% pour les papiers d'impression et de 10 à 30% pour les papiers de spécialité [203]. La couche de papier est caractérisée par la porosité empêchant l'encre de pénétrer dans la structure fibreuse du papier, et l'épaisseur qui est de 5 à 10 μm pour un couché léger (LWC), 8 à 16 μm pour un couché moyen, 14 à 26 μm pour un couché double. Une épaisseur de couche de 1 μm correspond à environ 1 g.m^{-2} de poids de couche. La précision d'application de l'épaisseur de couche est perturbée par la couche limite d'air à la surface du papier qui augmente avec la vitesse de la machine [203]. C'est pourquoi la sauce est appliquée à une pression supérieure à la pression ambiante. La quantité de sauce est généralement supérieure au poids de couche désiré, ce qui conduit à une recirculation de la sauce de couchage. De manière générale, le dosage de la sauce au poids de couche désiré peut être fait par lame, barre rotative, lame d'air, ou intégré à une tête de couchage rideau.

Le dosage à lame flexible ou rigide permet d'obtenir une épaisseur de couche de 10 μm , avec un meilleur profil d'épaisseur en utilisant une lame flexible. La tolérance de variation d'épaisseur de couche est de 1 μm sur plusieurs mètres de laize. En pratique, aucune formule basée sur les caractéristiques du papier et de la sauce, ne peut prédire exactement et précisément l'épaisseur de couche [203].

L'inconvénient du dosage à lame est la pression élevée d'environ 1000 N.m^{-1} exercée par la lame de dosage sur les agents bioactifs composant une sauce de couchage.

Cette pression génère un fort taux de cisaillement entre la lame de dosage et le papier qui risque d'endommager physiquement les agents bioactifs lors du dosage de la couche.

Le dosage est affecté par les forces appliquées à l'extrémité de la lame [203]. Au repos, la lame subit le système de charge de lame et la réaction du papier. Au démarrage sans sauce, la lame subit le frottement du papier et la force viscoélastique de compression dynamique du papier et du contre-rouleau. Lorsque le couchage démarre, la lame subit une force hydrodynamique de levage due à la sauce de couchage dans la zone entre la lame et le papier.

3.3.6 Isolation et de concentration de phages

Pratiquement, la matière première pour la fabrication industrielle à grande échelle de papier bioactif doit être disponible en quantité industrielle. Les phages ont l'avantage d'être très abondants.

La quantité de virus varie de 10^4 à 10^8 virus.mL⁻¹ [209] en milieu aqueux ; de 10^8 à 10^9 virus.g⁻¹ sec [210] dans de la terre et de 10^9 à 10^{11} virus.mL⁻¹ [211] dans les sédiments aquatiques. Malgré la grande concentration des phages dans leur environnement, il est nécessaire de concentrer les phages à l'aide de membranes d'ultrafiltration afin de les isoler, à partir d'un volume supérieur à 20 litres, généralement en six étapes [212] : une préfiltration pour enlever les particules de taille supérieure à 25 µm, une filtration tangentielle par une membrane 0,22 µm pour éliminer les bactéries, la concentration du volume de phages en 2 litres en utilisant une large membrane tangentielle de 0,85 m², la concentration du volume de phages en 250 mL en utilisant une petite membrane tangentielle de 0,1 m², une filtration stérilisée avec une seringue à filtre 0,22 µm, et enfin, une ultrafiltration de type *spin columns*⁵⁹ pour concentrer les phages en un volume de 2 mL.

⁵⁹ Cartouches de purification de petits volumes d'acides nucléiques par extraction en phase solide.

3.3.7 Propagation des phages

Avant leur utilisation dans une bio-encre puis sur le papier, les phages doivent être propagés, énumérés, caractérisés et stockés. Les phages obtenus par propagation sont appelés des lysats de phages. Dans une stratégie de contrôle de production de papiers bioactifs, il est important de respecter les méthodes et protocoles adéquats de propagation et de stockage de phages pour préserver leur intégrité et éviter la dérive génétique qui a lieu lorsque les phages sont maintenus par cycles d'amplification pendant un temps prolongé [213].

Les matériels utilisés pour la propagation des phages sont des bouillons de TSB stérilisés en deux volumes de 500 mL chacun, une culture de la bactérie hôte en bouillon TSB pendant une nuit (18h de croissance), un stock de phages, un incubateur à agitation réglé à 180 rpm, des bouteilles de centrifugation stériles, une bouteille stérile de 1 litre, une bouteille stérile comprenant un filtre de 0,45 µm.

La qualité du bouillon de TSB influence grandement la croissance de la bactérie *E.coli* et le rendement des phages. Nous utilisons de la poudre prémélangée de bouillon de TSB (trypticase de soja) de la plus haute qualité possible, prête à l'utilisation et qui ne requière qu'une dilution à l'eau avant stérilisation à l'autoclave. Cette façon de faire permet de réduire la variation potentielle dans la composition lorsque le milieu est préparé à partir de composants séparés et d'obtenir des résultats reproductibles d'un lot à un autre. À travers les années, les chercheurs ont constaté qu'un fournisseur bon marché de milieu de culture peut grandement influencer le rendement des phages ainsi que la pureté et la qualité de l'ADN des phages. Certaines souches bactériennes ont une bonne croissance dans différents milieux, mais l'efficacité de l'infection des phages est parfois une variable dépendante du milieu de culture utilisé. L'impact se retrouve au niveau de la vitesse de croissance des bactéries qui influence le rendement global de production de phages [213] : si la croissance des bactéries est trop rapide, un nombre de cellules non infectées interférera avec la purification des phages. Si la croissance des bactéries est trop lente, le rendement en phages sera faible. Il est conseillé de déterminer pour chaque phage le meilleur milieu de culture pour l'amplification des phages.

Dans certains cas, il a été observé que la préparation d'un milieu moins concentré (0,5x) donne d'excellents résultats tout en réduisant le coût d'amplification des phages, ce qui est particulièrement important lors de l'amplification d'importantes quantités industrielles de phages pour la fabrication de papier bioactif.

Les cinq étapes expérimentales de propagation de phages consistent à :

1. Inoculer 1 litre de TSB avec 5 mL de la bactérie hôte. Ajouter 500 mL de bouillon TSB dans chacune des 2 bouteilles d'un litre pour laisser suffisamment d'espace pour l'agitation. Incuber dans un incubateur à agitation à la température optimale de croissance de la bactérie hôte. Le temps d'incubation pour les entérobactéries telles qu'*E.coli* et *Salmonella* est de 2 heures tandis que le temps d'incubation pour les microorganismes à croissance lente tel que *Listeria* est de 5 heures.
2. La suspension bactérienne commence à devenir turbide durant la période entre 2 et 5 heures. Ajouter les phages à une concentration de 1 mL.L⁻¹. Incuber pendant une nuit dans un incubateur à agitation à 37°C pour *E.coli* (ou à 25°C dépendamment de la bactérie hôte) pour permettre l'attachement des phages.
3. Après la période d'incubation, transférer le lysat de phages dans les bouteilles de centrifugation stériles et centrifuger à 7000 g pendant 20 minutes.
4. Les cellules bactériennes ayant sédimenté, filtrer de manière stérile le surnageant avec les bouteilles stériles contenant des filtres de 0,45 µm. Répéter la filtration avec des filtres de 0,22 µm pour une purification additionnelle.
5. Le lysat de phages peut ainsi être directement utilisé pour la fabrication de papier bioactif, ou davantage purifié pour enlever les enzymes bactériennes et les toxines afin d'anticiper le niveau de pureté requis dans les applications alimentaires à usage humain.

Les phages peuvent être caractérisés pour les identifier et déterminer leur affiliation par rapport à d'autres phages connus. La méthode la plus communément utilisée est la microscopie électronique à transmission en utilisant la coloration négative des phages.

Cette dernière consiste à mélanger les solutions de phages avec une solution dense en électrons d'un sel de métal lourd (poids moléculaire élevé) tout en ayant une petite taille moléculaire. Le phosphotungstate (PT) et l'acétate d'uranyle (UA) sont les colorants les plus communément utilisés [214].

3.3.8 Énumération des lysats de phages

Les protocoles d'utilisation des bactériophages ont été utilisés dans la communauté des chercheurs pendant si longtemps que l'attribution de crédit pour leur développement est aujourd'hui pratiquement impossible.

La méthode utilisée pour l'énumération des bactériophages T4 est celle du recouvrement sur milieu de culture agar suivie de l'énumération des plages de lyses associées [215].

La méthode des plages de lyse consiste à diluer une préparation de phages et mixer la préparation avec une bactérie hôte avant de disperser uniformément le mélange sur un milieu de culture solide. Lors de l'incubation, la bactérie hôte forme un tapis sur le milieu de culture, à l'exception où les phages infectieux lysent ou inhibent la croissance des cellules, résultant en une zone localisée claire ou translucide, visible à l'œil nu, appelée plage de lyse. Ainsi, l'unité d'énumération de phages infectieux est appelée unité formant-plage ou communément « ufp ».

Les matériaux et équipement nécessaires ainsi que les méthodes expérimentales détaillées que nous avons suivis et que nous préconisons dans le cadre de la fabrication de papiers bioactifs sont présentés à l'annexe 2, 3 et 4, respectivement pour l'énumération des lysats de phages, l'isolation, et l'énumération de la bactérie hôte.

3.3.9 Impression d'une précouche cationique

La méthode d'impression d'une précouche cationique permet d'étudier l'influence de la nature d'immobilisation des phages à la surface du papier (section 4.2.7).

Des solutions de polymère cationique PolyDADMAC (section 3.1.8) ayant des densités de charge variant entre $0,5 \mu\text{eq.mL}^{-1}$ et $470 \mu\text{eq.mL}^{-1}$ sont préparées et leurs demandes anioniques mesurées par le titrateur BTG Mutek PCD-Titrator 3.

La demande anionique et cationique de la sauce de couchage du papier LWC utilisé pour l'impression de phages a aussi été mesurée par le titrateur. Celle-ci équivaut à $0,0097 \mu\text{eq.g}^{-1}$ (sec), ce qui correspond à une charge cationique du papier LWC utilisé de $0,078 \mu\text{eq.m}^{-2}$; négligeable par rapport aux densités de charges de PolyDADMAC sur le papier qui varient entre $14 \mu\text{eq.m}^{-2}$ et $1200 \mu\text{eq.m}^{-2}$. Le papier LWC n'a pas d'effet significatif sur les précouches cationiques.

Les précouches de PolyDADMAC sont imprimées sur des bandelettes de papier de 50×300 mm en utilisant la presse d'impression de laboratoire IGT avec le procédé d'impression gravure décrite à section 3.2.1, à 1 m.s^{-1} de vitesse d'impression et 500 N de force pneumatique.

La densité de charges des précouches cationiques (exprimée en meq.m^{-2}) est définie comme le produit de la densité de charges des solutions de PolyDADMAC (exprimée en meq.mL^{-1}) par le volume de la solution de PolyDADMAC qui est transférée de la molette d'impression gravure au papier (exprimée en mL.m^{-2}). Il est difficile de mesurer autrement la densité de charges exacte des solutions de PolyDADMAC après leur impression à la surface du papier, à cause de la pénétration du polymère PolyDADMAC à l'intérieur des fibres de cellulose [216].

3.3.10 Imprégnation de couche bioactive

Une méthode d'imprégnation de couche bioactive par-dessus une couche cationique de PolyDADMAC est utilisée pour isoler l'influence de tout procédé de transfert de phages par contact, sur l'orientation des phages à la surface du papier.

Un réservoir contenant des phages a été conçu pour permettre le transfert de phages à la surface du papier, uniquement par force capillaire due à la structure poreuse du papier.

Des solutions de phages T4 de 10^5 ufp.mL^{-1} ont été préparées en diluant un stock initial de phages (section 3.1.6) dans un tampon phosphate salin. Des quantités fixes de $450 \mu\text{l}$ de phages T4 sont alors incorporées dans un réservoir d'imprégnation du papier. La demande cationique de la solution de phages mesurée par titrateur est de $52 \mu\text{eq.mL}^{-1}$.

La quantité de phages imprégnée est de 100 mL.m^{-2} ou 10^7 ufp.m^{-2} . La demande cationique de la couche de phages sur le papier est de $5200 \text{ } \mu\text{eq.m}^{-2}$.

Les bandelettes à précouche de PolyDADMAC sont ensuite mises au contact du réservoir d'imprégnation de papier contenant les solutions de phages pendant 5 minutes, permettant une migration uniforme des solutions de phages du réservoir à la surface du papier. Les bandelettes de papiers sont alors conditionnées à 21°C et 90% d'humidité relative (HR) dans une boîte hermétique à humidité contrôlée.

3.3.11 Conditionnement des papiers bioactifs à base de phages

Les bandelettes de papier bioactifs sont conditionnées en boîte hermétique à 90% HR jusqu'à leur utilisation. L'ajustement d'une humidité relative équilibrée de 90% est réalisé en intégrant aux boîtes hermétiques des récipients de chlorure de baryum dihydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) légèrement imprégnés d'eau en s'assurant d'avoir des cristaux de sel solides en excès visibles en solution. D'autres solutions de sels saturés pour atteindre d'autres valeurs d'humidité relative d'équilibre sont standardisées [217].

3.3.12 Pulvérisation contrôlée des phages

La méthode de pulvérisation de phages permet d'obtenir un taux de transfert de 100% contrairement aux autres méthodes de transfert avec contact. La pulvérisation de phages est utilisée pour quantifier l'influence de l'humidité des papiers sur la bioactivité des phages sur le papier (cf. plan expérimental, section 4.2.6).

Chapitre 4 - Plan expérimental

La méthodologie de recherche décrite au précédent chapitre débouche sur un plan expérimental composé de deux phases qui mènent à atteindre l'objectif général du travail de thèse, tel que décrit à la section 1.3. Pour chaque phase, les difficultés à résoudre sont analysées et les étapes pour les résoudre sont traitées. En résumé, les principaux défis à relever lors de la fabrication de papier bioactif sont 1) l'agent bioactif doit rester actif sur le papier après les étapes conventionnelles de fabrication à grande échelle, 2) le papier doit être efficace pour tuer les bactéries potentiellement présentes sur l'aliment et en contact direct avec le papier, 3) le papier devra agir de manière autonome sans nécessiter des étapes subséquentes d'activation, et 4) le papier bioactif devra pouvoir être produit de manière économiquement rentable en grandes quantités.

Les deux phases pour relever les défis précédents sont 1) une phase reliée à une approche basée sur l'utilisation d'enzyme et 2) une phase reliée à l'utilisation des phages comme agents bioactifs.

Pour les enzymes, nous considérons:

- 1) la quantification de l'efficacité des papiers bioactifs à base d'enzymes,
- 2) la résistance des enzymes aux contraintes de fabrication, et
- 3) la conservation de la bioencres et des papiers bioactifs à base d'enzymes,

Pour les phages :

- 1) la quantification de l'efficacité des papiers bioactifs à base de phages,
- 2) la résistance des phages aux contraintes de cisaillement, à la fois en impression gravure et en couchage à lame,
- 3) l'influence de l'humidité et des conditions d'utilisation du papier bioactif,
- 4) l'influence de la nature d'immobilisation des phages et

5) l'influence de l'emplacement des phages sur la surface du papier ou l'influence de la porosité du papier.

En définitive, la première phase vise à développer une méthode d'immobilisation d'enzymes à la surface du papier alors que la deuxième phase vise à développer une méthode de fabrication de papier bioactif à base de phages pour le contrôle de bactéries.

4.1 Phase 1 - Développement d'une méthode d'immobilisation d'enzymes à la surface du papier

La première difficulté est reliée au fait que la plupart des enzymes de bonne qualité, *i.e.* purifiées, sont onéreuses à fabriquer en grande quantité. Le choix d'enzymes spécifiques et peu dispendieuses doit aussi s'accompagner d'une optimisation de leur taux de transfert sur le papier. En effet, un fort taux de transfert des biomolécules en réduit nécessairement la perte lors du procédé de fabrication ainsi que la contamination du procédé de fabrication et les coûts associés aux étapes de nettoyage et de recyclage des agents bioactifs non transférés au papier.

Les 8 étapes du plan d'expérience de la phase 1 sont représentées dans la Figure 4-1.

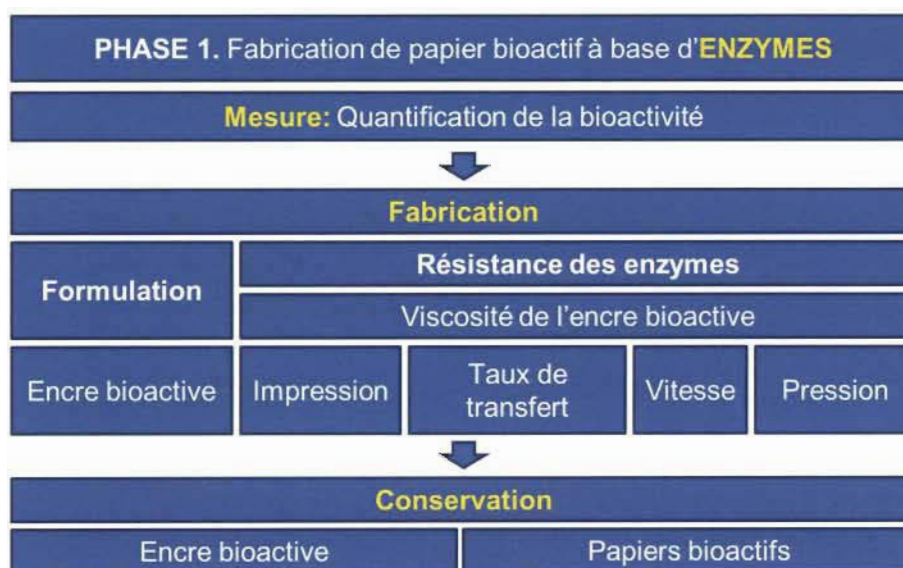


Figure 4-1 Phase 1: Fabrication de papier bioactif à base d'enzymes

4.1.1 Étape 1 – Définition des paramètres de fabrication des papiers par impression

L'objectif du plan expérimental d'utilisation des procédés d'impression gravure et de couchage à lame est d'évaluer la résistance mécanique des agents bioactifs aux contraintes de vitesse, de pression, de séchage et d'environnement non stérile. En effet, les biomolécules sont reconnues pour constituer des structures relativement fragiles qui ne peuvent résister aux pressions et aux contraintes exercées dans les presses d'impression modernes opérant à grande vitesse. Rappelons que l'objectif de la thèse est de démontrer la faisabilité de fabrication à grande échelle et en conditions industrielles de papiers bioactifs.

Le plan expérimental est réalisé en deux temps. En premier, l'influence de la viscosité de la bioencre est étudiée. En deuxième, l'influence des paramètres de vitesse et de pression d'impression et de couchage est évaluée. Les plages expérimentales de vitesse et de pression sont sélectionnées le plus largement possible de manière à couvrir au maximum les conditions de fabrication industrielle rencontrées lors du transfert technologique à échelle pilote. Une large plage expérimentale permet également d'augmenter la probabilité de découvrir des effets significatifs sur l'efficacité du papier bioactif.

L'avantage de faire varier les contraintes en conditions de cisaillement réelles et non de faire subir à la bioencre des contraintes de cisaillement dans un rhéomètre est que les contraintes réelles de fabrication sont une combinaison de plusieurs contraintes, nommément de compression, d'étirement et de cisaillement. Notre plan expérimental en laboratoire n'étant pas un plan d'optimisation, ce n'est qu'à l'échelle pilote que nous suggérons de mener un plan expérimental fractionnel qui isole les effets significatifs des effets combinés des différents paramètres.

4.1.2 Étape 2 – Optimisation du taux de transfert de l'encre sur le papier

Le taux de transfert de l'encre sur le papier est influencé par les propriétés physiques du papier de base, la formulation de l'encre et le procédé d'impression lui-même. Par conséquent, afin de valider le choix final du papier dans le plan expérimental, nous étudions l'influence de trois types de papiers de base : un papier non couché en feuilles (section 3.1.2.1), un papier couché léger (LWC, pour *light weight coated*) en feuilles (section 3.1.2.2) et un papier non couché au sulfite, aussi en feuilles (section 3.1.2.3).

4.1.3 Étape 3 – Formulation et impression d'une bio-encre sur le papier

Une première encre est formulée à base de colorant et d'un modificateur de viscosité. Ce choix permet de simuler et prédire la réponse de quantité de transfert d'agents bioactifs qui seraient autrement non visibles à la surface du papier. De plus, ce choix évite d'induire des paramètres expérimentaux potentiellement significatifs, mais inconnus à cette étape précoce de la recherche.

Une deuxième encre bioactive, que nous appelons « bio-encre », est issue d'une adaptation de la méthode de formulation de la bio-encre à base d'enzymes HRP, décrite à la section 3.3.1, en conservant les mêmes propriétés rhéologiques. La viscosité (Brookfield) de la bio-encre est de 43,2 mPa.s. Le papier bioactif ainsi fabriqué permet la détection visuelle de présence du peroxyde d'hydrogène, un composé impliqué dans la dégradation de certains aliments.

La méthode utilisée pour le transfert de la bio-encre sur le papier est la méthode d'impression gravure, décrite à la section 3.3.3. La vitesse d'impression est réglée à 0,6 m.s⁻¹. La force d'impression est fixée à 500 N. Le volume spécifique des alvéoles de gravure utilisé est de 20 mL.m⁻².

4.1.4 Étape 4 – Quantification de la bioactivité des papiers bioactifs à base d'enzymes

Après l'impression des papiers bioactifs à base d'enzymes, la méthode de révélation des papiers consiste préalablement à les laisser sécher pendant 1 heure. Tel qu'illustré à la Figure 4-2, l'utilisation des papiers bioactifs utilise le principe de capillarité et consiste à mettre la face non imprimée du papier au contact d'une solution de H_2O_2 à 10 mmol.L^{-1} pendant 20 secondes. Lorsque le chromogène présent dans la bioencre est oxydé, il devient vert, colorant quasi instantanément le papier en vert.

Les papiers sont ensuite essuyés sur du papier buvard pour enlever l'excès de solution avant d'être mis à l'air libre en environnement conditionné à 23°C et 50% d'humidité relative pendant 2 heures. Ils sont ainsi prêts à être analysés au spectrophotomètre Technidyne Colour Touch PC. L'indice ΔE (delta E) permet de comparer quantitativement la différence de couleur entre un papier bioactif non imprimé et un papier bioactif révélé, en utilisant le principe détaillé à la section 3.2.2.

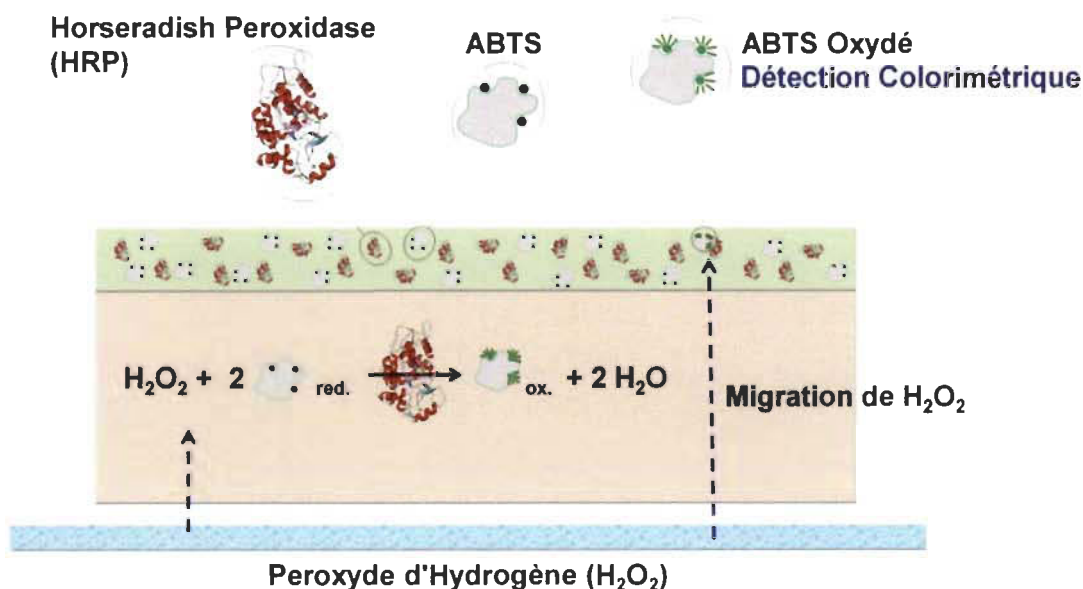


Figure 4-2 Méthode d'utilisation des papiers bioactifs à base d'enzyme HRP

La Figure 4-3 (à droite) illustre le papier bioactif imprimé, et le papier imprimé et révélé avec du peroxyde d'hydrogène (à gauche).



Figure 4-3 Papier bioactif à base d'enzyme HRP

4.1.5 Étape 5 – Étude de la résistance des enzymes aux contraintes d'impression : viscosité de la bioencre

L'objectif de cette étape est de déterminer la résistance des agents bioactifs utilisés aux contraintes de cisaillement reliées à l'augmentation de la viscosité de la bioencre. En effet, tel que discuté en introduction, la modification de la viscosité de la bioencre influence les contraintes de cisaillement subies durant le transfert des agents bioactifs sur le papier.

Cependant, les changements de la viscosité de la bioencre modifient le taux de cisaillement lors du procédé d'impression gravure, ce qui modifie également le taux de transfert de la bioencre sur le papier [218]. Par ailleurs, l'efficacité du papier bioactif dépend simultanément de la quantité de transfert de la bioencre et des détériorations qui peuvent être causées au complexe HRP-ABTS par les contraintes de cisaillements subies durant le transfert. C'est pourquoi nous avons utilisé un colorant pour séparer l'effet de la quantité de transfert de la bioencre de l'effet dommageable des contraintes de cisaillement. L'impression d'un simple colorant a donc été réalisée avec les mêmes paramètres d'impression que la bioencre, en prenant pour hypothèse que les valeurs de différence de couleur ΔE du colorant dépendent uniquement du transfert d'encre.

Ainsi, une comparaison des tendances de ΔE pour le colorant et la bioencre peut donner une information sur l'effet physique (cisaillement) ainsi que l'effet chimique potentiel du CMC [56] sur l'enzyme et la réaction d'oxydation.

Lors de ce plan expérimental, le paramètre de viscosité (Brookfield) de la bioencre varie de 0 à 800 mPa.s, tandis que tous les autres paramètres restent inchangés. La vitesse d'impression est fixée à $0,6 \text{ m.s}^{-1}$, la force d'impression fixée à 500 N, tandis que le volume spécifique des alvéoles demeure constant à 20 mL.m^{-2} . L'analyse des résultats est présentée à la section 5.1.

4.1.6 Étape 6 – Étude de la résistance des enzymes aux contraintes d'impression : vitesse et pression d'impression

L'influence des contraintes de cisaillement sur la bioactivité des enzymes est étudiée en faisant varier le paramètre expérimental de vitesse d'impression (m.s^{-1}) à trois niveaux et le paramètre de force d'impression (N) à deux niveaux. La seule réponse analysée est la bioactivité des papiers exprimée en différence de couleur (ΔE) entre le papier de base non imprimé et le papier imprimé et révélé au peroxyde d'hydrogène après impression.

La Figure 4-4 représente le plan expérimental utilisé. L'analyse des résultats de différence de couleur (ΔE) est présentée à la section 5.1.

Vitesse d'impression (m/s)	Force d'impression (N)
2,4	1000
0,6	500
1,2	1000
0,6	1000
1,2	500
2,4	500

Figure 4-4 Plan factoriel d'influence de la vitesse et de la pression d'impression

4.1.7 Étape 7 – Étude du temps de stockage de la bioencre

Les conditions de conservation de la bioencre dans le temps peuvent influencer significativement l'efficacité des papiers bioactifs en conditions d'utilisations commerciales, ainsi que les résultats expérimentaux pendant leur développement.

Pour atteindre notre objectif de thèse, il est important de dégager les paramètres de conditions de fabrication et d'utilisation des papiers bioactifs, afin d'en fixer les paramètres expérimentaux lors du développement du papier bioactif et lors de la définition des fenêtres d'utilisation des papiers bioactifs.

Le plan expérimental de caractérisation de l'effet du temps de stockage de la bioencre consiste à examiner la stabilité de la réponse de bioactivité de la bioencre au cours du temps pour en déterminer la durée valide d'utilisation. L'évolution du pouvoir catalytique de l'enzyme est ensuite analysée en comparant les mesures colorimétriques prises selon l'âge de l'échantillon. Les deux environnements de conditionnement qui sont analysés sont 1) en salle conditionnée à 23°C et 50% d'humidité relative et 2) dans le noir à 5°C et 90% d'humidité relative. Après chaque conditionnement, les papiers sont évalués selon la méthode décrite à la section 4.1.4. Les conditions d'impression sont force (F) d'impression à 500 N; vitesse (V) d'impression de 0,6 m.s⁻¹; viscosité de l'encre (η) de 62,3 mPa.s et volume spécifique des alvéoles de 20 mL.m⁻².

4.1.8 Étape 8 – Étude des conditions de stockage des papiers bioactifs à base d'enzymes

La revue de la littérature ne dévoile aucune étude sur la résistance des couches bioactives à base d'enzymes aux conditions de stockage et d'utilisation lorsque celles-ci sont imprimées sur du papier. Pour dégager les grands principes d'utilisation, nous avons utilisé les enzymes pour évaluer leur conservation sur support papier. Les phages, objet principal de notre approche, font l'objet d'une analyse plus approfondie à la section 4.2.6.

L'influence des paramètres de lumière et de température est analysée en examinant trois conditions d'entreposage : chambre froide à l'obscurité, salle à humidité contrôlée et salle à humidité contrôlée à l'obscurité. Les conditions d'impression sont comme précédemment (F= 500 N; V= 0,6 m.s⁻¹; η = 62,3 mPa.s; volume spécifique des alvéoles= 20 mL.m⁻²).

4.2 Phase 2 : Développement d'une méthode de fabrication de papier bioactif à base de phages pour le contrôle de bactéries

Dès 1997, la faisabilité d'adsorption physique de phages *Sapphire* sur une surface en polystyrène a été démontrée lors de la séparation sélective de bactéries *Salmonella* à partir de matrices alimentaires [107]. Cependant, une faible efficacité de capture des bactéries a pu être observée. La raison potentielle alors proposée est que l'orientation des phages sur la surface solide n'étant pas optimisée, l'adsorption passive utilisée implique que l'immobilisation pourrait avoir lieu soit *via* la tête des phages, soit *via* la queue des phages. La deuxième raison proposée est la faible surface spécifique du substrat de polystyrène utilisé [107]. Notons que dans cette publication de Bennett *et al.*, le polystyrène a été utilisé principalement pour la facilité expérimentale qu'offre sa faible surface spécifique, *i.e.* une surface plane à priori plus simple pour immobiliser des phages. A contrario, le substrat papier que nous utilisons présente une grande surface spécifique ainsi qu'une épaisseur de pénétration des phages dans la structure du substrat, ce qui aura un effet positif sur l'efficacité d'adsorption des phages, et ce, à condition de contrôler le paramètre expérimental de rugosité et de porosité de surface par une fermeture contrôlée de la structure du papier, via le raffinage de fibres. La structure de papier est certes plus complexe que la surface de polystyrène, mais aussi beaucoup plus flexible. Le papier permet surtout d'optimiser la pénétration des phages dans la structure du papier, *i.e.* il procure une plus large flexibilité expérimentale pour l'immobilisation de phages dans l'axe d'épaisseur du papier. La nature des fibres et leur degré de raffinage permettent de contrôler la surface spécifique externe et interne du papier, de manière à s'adapter aux exigences d'efficacité d'immobilisation des agents bioactifs.

La phase 2 du plan expérimental est de démontrer de manière originale la faisabilité d'immobilisation physique des phages sur une surface tridimensionnelle telle que constitue le papier, offrant une grande surface spécifique, une contribution au défi d'orientation des phages, et la démonstration de l'influence significative de certains paramètres papier sur la bioactivité des papiers, avec en prime l'utilisation de méthodes de fabrication conventionnelles et un substrat recyclable et biodégradable.

La pulvérisation liquide de phages directement sur la surface des aliments pour améliorer la sécurité des aliments a été récemment approuvée [219] aux États-Unis. L'utilisation d'un support papier pour transporter les phages est une approche originale qui permet d'adresser certains inconvénients de la pulvérisation directe, telle que le gaspillage de grandes quantités de phages, la désactivation des phages par les résidus des agents désinfectants utilisés en amont de la chaîne de transformation des aliments et l'augmentation de la croissance bactérienne due à la présence de nutriments dans le liquide transportant les phages.

Les résultats de la phase 2 sont une contribution originale qui a d'ores et déjà été citée dans un livre [220] au chapitre des approches d'immobilisation de phages sur une surface pour le développement de biocapteurs pour le contrôle de bactéries.

Les 8 étapes du plan d'expérience de la phase 2 sont représentées dans la Figure 4-5.

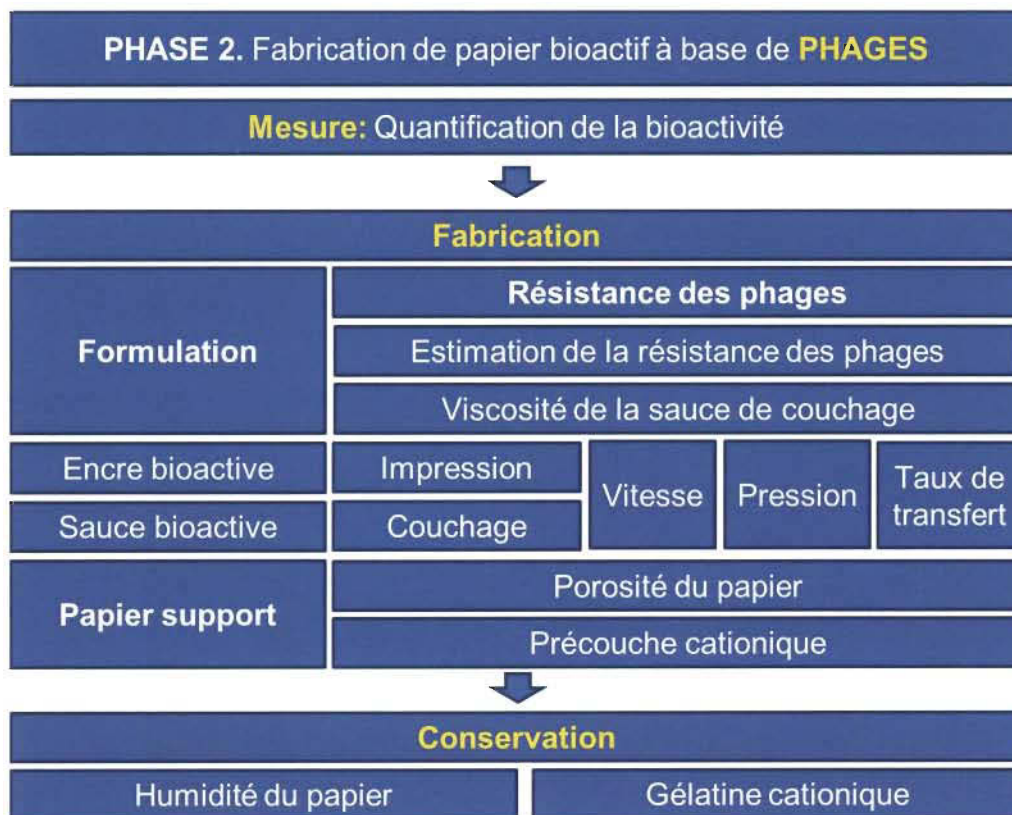


Figure 4-5 Phase 2: Fabrication de papier bioactif à base de phages

4.2.1 Étape 1 – Formulation d'une bioencre à base de phages et l'imprimer sur papier

L'impression de bioencre à base de phages consiste à appliquer la méthode d'impression décrite à la section 3.3.3 pour imprimer la bioencre à base de phages de la section 3.3.2 sur le papier LWC en feuilles, Tableau 3-2.

4.2.2 Étape 2 – Développement d'une méthode de quantification de l'activité d'un papier bioactif à base de phages

La quantification de l'efficacité des phages après leur transfert sur papier représente un défi de taille, mais c'est une étape cruciale avant de pouvoir mener les étapes subséquentes d'étude et de développement de papiers bioactifs. Toutes les études sur la bioactivité des phages sont réalisées en milieu liquide et aucune publication, à notre connaissance, ne rapporte de méthode de quantification de l'efficacité d'un papier bioactif à base de phages pour le contrôle de bactéries. Pour y arriver, les méthodes et protocoles expérimentaux d'utilisation des phages en milieu liquide et sur gélose [221] sont préalablement étudiés pour appréhender les facteurs qui pourraient influencer significativement la méthode d'utilisation et de quantification de l'efficacité des phages sur les papiers bioactifs, développée et décrite à la section 5.2.

4.2.3 Étape 3 – Estimation de la résistance des phages aux contraintes de cisaillement en impression héliogravure

L'objectif de cette étape est d'étudier la résistance des phages aux contraintes de cisaillement subies en impression gravure. Nous n'avons pu trouver aucune étude publiée sur la résistance des agents bioactifs aux contraintes de cisaillement subies lors d'un procédé conventionnel d'impression ou de couchage. Par conséquent, nous avons été amenés à estimer les ordres de grandeur de la résistance mécanique d'agents bioactifs. La conclusion est que, si les forces de cisaillement dans une pince d'impression sont grandes, elles ne sont cependant pas trop élevées pour détériorer les fonctions biologiques des molécules bioactives. Ces calculs d'estimation sont décrits plus loin, à la section 5.3.

4.2.4 Étape 4 – Étude de la résistance des phages aux contraintes d'impression gravure : vitesse et pression

L'effet nuisible des contraintes de cisaillement sur la bioactivité a été démontré pour le papier bioactif à base d'enzymes à la section 5.1. Cependant, aucune étude n'est publiée sur un papier bioactif à base de phages.

La résistance des phages aux contraintes de cisaillement est évaluée de manière expérimentale. Pour cela, nous explorons la fenêtre d'opération du procédé d'impression gravure décrit à la section 3.3.3 afin d'étudier l'influence des paramètres d'impression et de pression d'impression sur la bioactivité des phages.

Le plan expérimental consiste à examiner les vitesses d'impression de $0,2 \text{ m.s}^{-1}$, 1 m.s^{-1} et 2 m.s^{-1} ainsi que les forces d'impression de 100 N, 300 N et 600 N. La bioencre est formulée selon la méthode décrite à la section 3.3.2. La bioactivité des papiers est quantifiée selon la méthode décrite à la section 5.2, directement après l'impression de la bioencre de phages, sans séchage préalable du papier, de manière à exclure l'effet de l'humidité du papier des facteurs influençant la bioactivité des phages sur le papier. Les résultats de cette étude sont présentés à la section 5.4.

4.2.5 Étape 5 – Étude de la résistance des phages aux contraintes de couchage à lame: vitesse et pression

L'estimation de la résistance des phages aux contraintes de cisaillement subies lors du procédé d'impression gravure présentée à la section 5.3 montre que le procédé d'impression gravure ne permet pas d'atteindre la limite de résistances des phages, et ce, aux contraintes typiques de cisaillements explorés. La tolérance des phages aux contraintes d'impression gravure peut être due à l'absence de séchage des papiers bioactifs ou à la résistance intrinsèque des phages. L'influence du séchage sur l'efficacité des papiers bioactifs est explorée à l'étape de la section 4.2.6 ci-après.

À l'étape 5, des expériences de couchage sont conçues pour tester la faisabilité de fabrication industrielle de papiers bioactifs avec le procédé de couchage à lame.

L'emphase est ici mise sur la résistance des phages aux plus forts taux de cisaillement subis entre la lame de couchage et le papier tel que discuté à la section 3.3.5.

Le plan expérimental consiste en l'application d'une sauce de couchage (section 3.3.4) par couchage à lame (section 3.3.5) suivie d'un séchage à haute intensité du papier bioactif par infrarouge à 36kW pendant 30 secondes.

Les trois paramètres expérimentaux explorés sont l'espacement entre la lame de couchage « docteur » et le papier, la vitesse de couchage, et la viscosité de la sauce de couchage. Les espaces entre la lame docteur et le papier sont -8.10^{-3} po (203 μ m), -4.10^{-3} po (101 μ m), -2.10^{-3} po (50 μ m), 0 po, 2.10^{-3} po (-50 μ m) et 4.10^{-3} po (-101 μ m). L'espace est négatif lorsque la lame docteur qui est flexible est davantage écrasée sur le papier pour appliquer moins de matière. Les vitesses de couchage sont 100, 200, 300, 400, 500 et 600 m.min⁻¹. Les deux viscosités de la sauce de couchage sont 100 mPa.s et 250 mPa.s. La réponse de bioactivité des papiers bioactifs est quantifiée par l'aire de la zone de lyse bactérienne (mm²) selon la méthode décrite à la section 5.2. Les résultats de cette étude sont présentés à la section 5.6.

4.2.6 Étape 6 – Étude de l'influence de l'humidité sur l'efficacité des papiers bioactifs

Les résultats de l'étape 4 et 5 démontrent qu'il est possible de fabriquer un papier bioactif à base de phages, en utilisant les méthodes conventionnelles d'impression et de couchage. Cependant, malgré la résistance des agents bioactifs aux contraintes de fabrication, il n'en demeure pas moins que les papiers bioactifs après fabrication peuvent être fragiles et peu durables, donc d'utilisation pratique limitée dans le cadre des emballages. La revue de la littérature nous enseigne que le couchage par enduction utilisé pour la fabrication d'emballages antimicrobiens pose une problématique de fragilité de la couche antimicrobienne aux manipulations inadéquates [172], tel que présenté à la section 2.6.1. Cependant, aucune étude ou essai pour tenter de protéger la couche fragile n'a encore été publiée.

Nous nous proposons d'étudier les paramètres qui influenceraient significativement l'efficacité des papiers bioactifs à base de phages. Cette étape est consacrée au paramètre d'humidité des papiers bioactifs qui s'est avéré influencer significativement l'efficacité des papiers bioactifs, lorsque les échantillons de papiers sont testés au contact de bactéries. En effet, nous avons remarqué que lorsque le papier bioactif est utilisé pour le contrôle de bactéries, celui-ci conservait sa bioactivité, mais lorsque le papier commence à sécher à l'air libre, la bioactivité du papier diminue drastiquement avec le temps. Le phénomène est analysé et décrit à la section 5.5 et illustré à la Figure 5-13.

Le plan expérimental consiste à quantifier l'effet de l'humidité des papiers bioactifs, selon la méthode décrite à la section 3.3.11, en utilisant la méthode de pulvérisation contrôlée de phages, décrite à la section 3.3.12. L'effet de la réhumidification du papier sur sa bioactivité est ensuite testé avant d'être quantifié. La sensibilité de la couche bioactive au séchage des papiers est ensuite contrôlée par utilisation de gélatine, introduite précédemment à la section 3.1.9. Les résultats de cette partie du plan expérimental sont présentés à la section 5.5.

4.2.7 Étape 7 – Étude de l'influence de la nature d'immobilisation des phages : utilisation d'une précouche cationique

L'immobilisation physique de phages sur la cellulose par adsorption physique est la méthode qui a été privilégiée jusqu'à présent, et ce, suite à l'analyse des différentes options de la section 2.4. L'immobilisation physique a donc été utilisée tout au long de notre travail, même si, selon la revue de littérature, les phages T4 non génétiquement modifiés et adsorbés à la surface de la cellulose interagiraient avec la cellulose grâce à leurs zones bioactives [105]. Il faut noter que les fibres de queue (fibrines) sont celles utilisées par le phage pour s'adsorber à la surface de la bactérie. L'intérêt d'utiliser des phages non génétiquement modifiés a été discuté précédemment (2.4.1.2, Immobilisation physique de bactériophages). Les résultats de l'étude de la résistance des phages aux contraintes d'impression (section 5.4) et de couchage (section 5.6) confirment qu'il est possible d'imprimer à grande vitesse des bactériophages de manière simple sur le papier, de sorte à maintenir une certaine bioactivité. Il est cependant évident que les phages ne se retrouvent pas tous immobilisés dans une position optimale

pour infecter les bactéries. Cependant, en raison du grand nombre de phages déposés, certains se retrouvent nécessairement et statistiquement dans la bonne position : fibrilles à la verticale du papier en disposition pour infecter toute bactérie arrivant en contact avec la surface du papier. Le présent travail tente d'améliorer cet effet statistique en optimisant le positionnement des phages dans l'axe d'épaisseur du papier.

L'approche expérimentale consiste à améliorer, de manière économique, la qualité d'immobilisation physique de phages non génétiquement modifiés, en favorisant une interaction électrostatique entre la tête des phages et le papier, pour tenter d'orienter les phages à la surface du papier (Figure 4-6), et d'amplifier la sensibilité du papier bioactif, tout en évitant de modifier chimiquement les fibres cellulosiques ou d'ajouter des étapes intermédiaires qui constitueraient des goulots d'étranglement lors d'une fabrication économiquement rentable de papier bioactif. Notre hypothèse est qu'une précouche cationique devrait permettre d'immobiliser les phages nettement anioniques à la surface du papier, tandis que la queue nettement cationique serait librement accessible pour détecter les bactéries qui surviendraient à son contact.

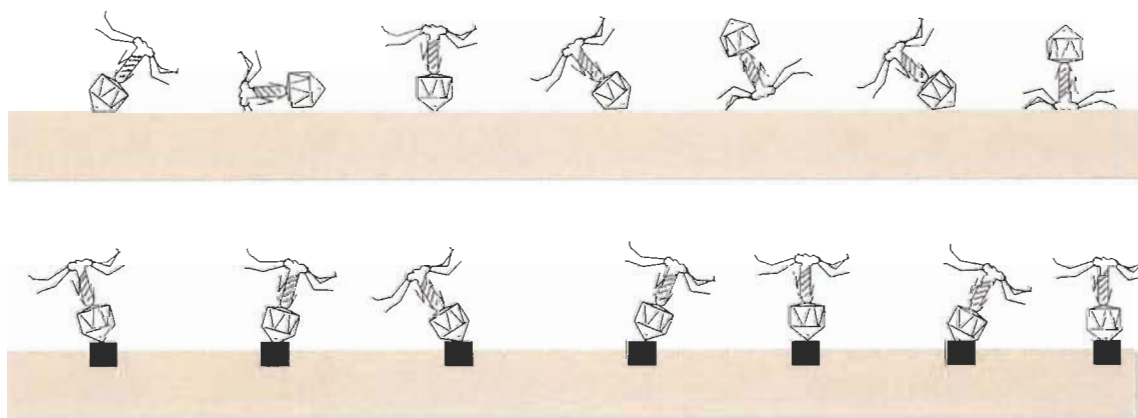


Figure 4-6 Représentation schématique des phages sur la surface du papier

Le plan expérimental consiste à pré-imprimer une précouche cationique à base de PolyDADMAC (section 3.3.9) à la surface d'un papier composé de fibres de Kraft blanchi sans additifs, à appliquer les phages en deuxième couche (section 3.3.10 Imprégnation de couche bioactive), à contrôler l'humidité des papiers bioactifs (section 3.3.11), et enfin à quantifier la bioactivité des papiers (section 5.2).

La quantification de la densité de charge cationique sur le papier est complexe : la densité de charge cationique de la bioencre utilisée varie entre $0,5 \mu\text{eq.mL}^{-1}$ et $470 \mu\text{eq.mL}^{-1}$.

La méthode expérimentale est basée sur les affinités entre la précouche de PolyDADMAC adsorbé à la surface du papier et les phages.

4.2.8 Étape 8 – Étude de l'influence de l'emplacement des phages sur l'efficacité des papiers bioactifs : porosité du papier

Le papier est un substrat renouvelable, recyclable, naturel, peu dispendieux et facile à fabriquer. En revanche, l'hétérogénéité et la porosité du papier sont des propriétés difficiles à quantifier de manière précise. La porosité du papier peut être un paramètre significatif dans l'efficacité des papiers bioactifs dans le sens qu'elle est à la fois une traduction de la rugosité de surface et qu'elle peut contrôler le transfert de la sauce de phages. Il est logique de concevoir que pour une optimisation de l'efficacité d'un papier bioactif utilisé en contact alimentaire à la surface du papier, il importe que les agents bioactifs soient immobilisés à la surface du papier. Il importe également que les phages puissent être relargués au contact d'un aliment. Cette propriété est plus importante que celle de l'immobilisation solide des phages à la surface du papier. Les phages doivent être capables de migrer du papier vers l'aliment emballé, donc être « maintenus en surface du papier » et pouvoir s'en détacher facilement : deux propriétés en apparence contradictoires.

La densité surfacique des phages sur le papier (nombre de phages par mm^2 de papier) n'est pas facile à quantifier précisément, d'autant plus qu'il est difficile de distinguer sans ambiguïté la surface du papier de la structure poreuse interne [222]. L'autre question sans réponse est de savoir si le positionnement des phages sur le papier influence significativement l'efficacité des papiers bioactifs. Bien que les phages soient peu coûteux à produire comparativement à d'autres agents bioactifs, il n'est pas efficace que des milliards de phages, d'une taille de l'ordre du nanomètre, soient dissimulés dans la structure poreuse du papier, voire à l'intérieur du lumen des fibres, les rendant inaccessibles au contact avec des bactéries d'une taille de l'ordre du micromètre.

La contribution originale à cette étape est de répondre à cette problématique par le contrôle de l'emplacement des phages en surface du papier et d'évaluer l'effet de l'emplacement sur l'efficacité des papiers bioactifs. Ceci tout en utilisant une méthode conventionnelle d'impression gravure qui permet un certain contrôle de la distribution des phages dans la structure du papier (impression à partir d'alvéoles), contrairement aux méthodes expérimentales d'imprégnation des papiers [223]. Selon la revue de la littérature, seule la solution de brossage des fibres est utilisée pour réduire la perméabilité du papier aux microorganismes. Aucune étude sur le raffinage de la pâte comme solution alternative n'a été encore publiée, alors que – pour un papetier – l'effet du raffinage de la pâte, discuté à la section 3.1.2.5, pourrait permettre de contrôler les propriétés de perméabilité du papier aux microorganismes néfastes, de manière plus simple et, de plus, économiquement viable.

La méthode utilisée pour influencer l'emplacement des phages sur le papier est de contrôler la porosité du papier de base, avant d'imprimer les phages sur de tels papiers à porosités contrôlées. En effet, le raffinage des fibres modifie la structure poreuse du papier et lorsque le papier absorbe le liquide transportant les phages grâce aux forces capillaires et à la nature hydrophile de la cellulose, la pénétration des phages en profondeur du papier serait alors uniquement influencée par la distribution de la structure poreuse du papier, car la tension de surface du papier (angle de contact ou degré d'étalement de la solution de phages sur le papier) et la chimie de surface du papier, qui influenceraient également la pénétration des phages dans la structure du papier [90] demeurent constants.

Le plan expérimental consiste à modifier la porosité du papier par raffinage de la pâte à papier utilisée pour la fabrication des papiers de base. Les méthodes de raffinage de la pâte, de fabrication des différents papiers à porosité contrôlée, de mesure de la perméabilité à l'air du papier, sont décrites à la section 3.1.2.5. Les papiers bioactifs sont fabriqués par impression gravure (3.3.3), leur efficacité est quantifiée (4.2.2) et les résultats analysés (5.9).

Chapitre 5 - Résultats et analyses

5.1 Fabrication de papier bioactif à base d'enzymes

Cette section présente et analyse les résultats de la phase 1 du plan expérimental (4.1 Développement d'une méthode d'immobilisation d'enzymes à la surface du papier).

Les enzymes sont utilisées dans ce travail comme premiers agents bioactifs, pour les raisons discutées précédemment (2.3.3).

Optimisation du taux de transfert de l'encre sur le papier

La Figure 5-1 présente les résultats de l'influence des trois papiers de base (section 3.1.2), sur la quantité de transfert d'enzymes HRP par la méthode d'impression gravure (section 3.3.3). La bioactivité des papiers est quantifiée selon la méthode (section 4.1.4) où ΔE représente la différence de couleur entre le papier non imprimé et le papier imprimé et révélée au peroxyde d'hydrogène, juste après impression.

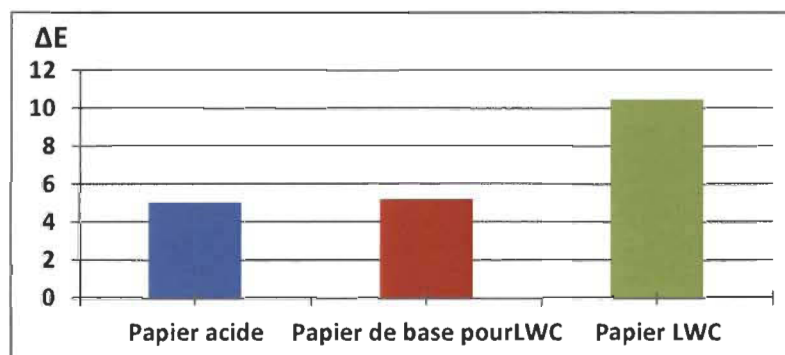


Figure 5-1 Réponse colorimétrique des papiers bioactifs selon le papier de base

Les résultats de la réponse colorimétrique des papiers bioactifs selon le papier de base utilisé montrent que le papier LWC donne le meilleur rendu colorimétrique pour la détection du peroxyde d'hydrogène juste après impression, les deux autres présentent à peu près le même rendu. La comparaison entre le papier de base pour LWC et le papier LWC nous donne l'influence de la couche ; tout comme pour une encre conventionnelle, le couchage améliore l'imprimabilité du papier en maintenant l'encre transférée en surface du papier avec une absorption limitée.

Ainsi, le transfert de bioencre des alvéoles en surface du papier est supérieur pour le papier LWC, ce qui explique une couleur plus intense. Les papiers non couchés (de base pour LWC et acide) ont quasiment la même rugosité de surface (cf. Tableau 3-1 et Tableau 3-3), et probablement le même pouvoir absorbant, le transfert devrait être du même ordre de grandeur. Aucune influence de l'acidité des papiers n'a été mise en évidence dans le cadre de l'étude, des recherches complémentaires⁶⁰ seraient nécessaires pour s'assurer dans le cas général de l'influence des propriétés de chimie de surface, mais alors surtout sur les agents bioactifs ; ce qui ne faisait pas partie de notre étude.

Par conséquent, les impressions subséquentes de papier bioactif à base d'enzymes et de phages sont réalisées avec le papier LWC, dont les propriétés physiques sont présentées au Tableau 3-2.

Résistance des enzymes aux contraintes d'impression : viscosité de la bioencre

La Figure 5-2 illustre les résultats de l'influence de la viscosité de l'encre sur le changement de couleur ΔE pour l'encre bioactive et l'encre de colorant. En encart (coin inférieur gauche), les résultats sont normalisés par la valeur maximale de ΔE dans les deux cas afin de faciliter la comparaison.

Les résultats du transfert avec l'encre de colorant démontrent l'influence de la viscosité sur le transfert. La quantité de CMC introduite influe directement sur la viscosité de l'encre. Le transfert peut être évalué de manière colorimétrique, car plus il y a d'encre en surface du papier, plus la couleur est intense.

L'augmentation de la viscosité de l'encre (grâce au CMC) améliore la quantité transférée jusqu'à un maximum autour de 50 mPa.s. Au-delà la viscosité est trop importante pour permettre un bon remplissage des alvéoles gravure et le transfert diminue légèrement.

⁽⁶⁰⁾ De telles études ont été en partie effectuées par Gabriel Saint-Pierre-Lemieux, dans le cadre d'une maîtrise [220] effectuée à l'UQTR et du réseau Sentinel.

En définitive, nous avons observé que le ΔE est constant pour toutes les viscosités de formulation d'encre, suggérant que le transfert d'encre est à peu près constant dans la plage de viscosités considérée.

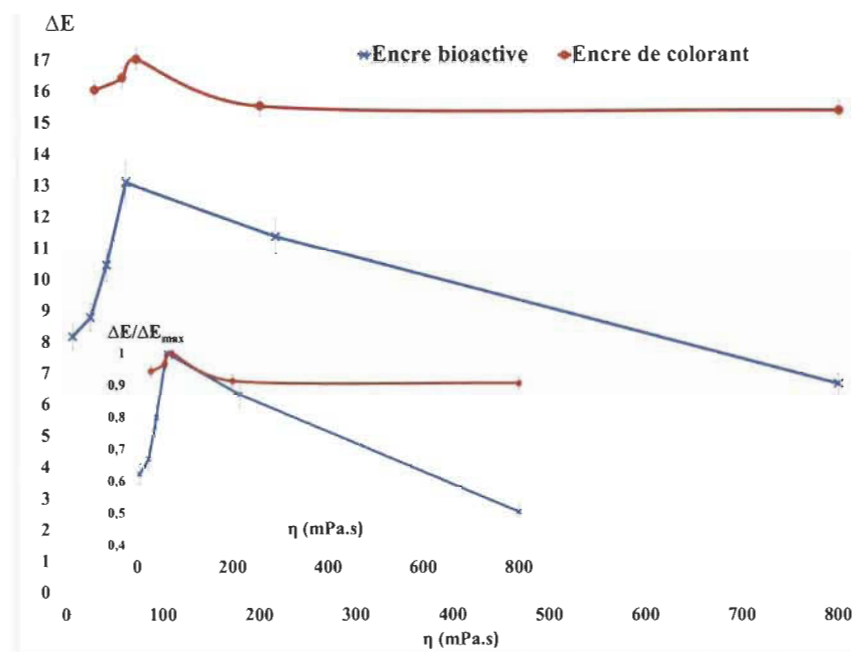


Figure 5-2 Effet de la viscosité d'encre sur la bioactivité du papier

Les résultats du transfert avec la bioencre démontrent également l'influence du CMC sur la réaction d'oxydation du chromogène. Les mesures colorimétriques des papiers bioactifs sont liées à la quantité de chromogène oxydé. L'enzyme catalyse la réaction. Dans la gamme des faibles viscosités (jusqu'au transfert optimum à 50 mPa.s), la couleur des papiers révélés croît plus rapidement que le transfert ; la présence du CMC en faibles quantités semble favoriser la réaction d'oxydation. Une explication envisageable est que le CMC en séchant forme un réseau qui maintient l'ABTS et l'enzyme plus en surface du papier. À contrario, pour les fortes viscosités, la couleur des papiers révélés décroît plus rapidement que la quantité transférée. La baisse d'activité peut possiblement être attribuée aux forces de cisaillement de plus en plus élevées subies par l'enzyme. Avec l'hypothèse du fluide newtonien généralisé, l'augmentation de viscosité entraîne l'augmentation des forces de cisaillement selon l'équation (1) de la section 5.3. La présence de CMC en grandes quantités (au-delà d'une viscosité de 50 mPa.s) semble influencer négativement la réaction d'oxydation de l'ABTS [56].

Une autre explication serait que le réseau formé par le CMC soit trop dense et que l'analyte H_2O_2 ait de la difficulté à atteindre les réactifs. Cependant, ces dernières hypothèses nécessiteraient des recherches supplémentaires pour être confirmées.

Résistance des enzymes aux contraintes d'impression : vitesse d'impression

La vitesse d'impression réduit le temps de passage de la feuille dans la zone de pincement. Le papier doit absorber la même quantité d'encre, mais plus rapidement. La littérature rapporte que la vitesse n'influence que peu le taux de transfert [189]. La vitesse influence surtout le taux de cisaillement.

La Figure 5-3 compare les valeurs de ΔE de l'encre de colorant et de l'encre bioactive à une viscosité constante (*i.e.* concentration constante de CMC), mais à différentes vitesses d'impression (la pression reste fixée à 500N). Les résultats illustrés à la Figure 5-3 démontrent que le transfert d'encre est constant, comme indiqué par les valeurs ΔE de l'encre de colorant. Cependant, les valeurs ΔE résultant de l'impression d'enzyme HRP suivie de l'oxydation d'ABTS sont plus faibles à des vitesses d'impression élevées. Ce résultat pourrait être associé à une augmentation des contraintes de cisaillement à des vitesses plus élevées et à viscosité constante, considérant que notre estimation de la résistance mécanique des enzymes aux contraintes de cisaillement (section 5.3) est de l'ordre de grandeur des contraintes d'impression que nous avons fait subir aux enzymes.

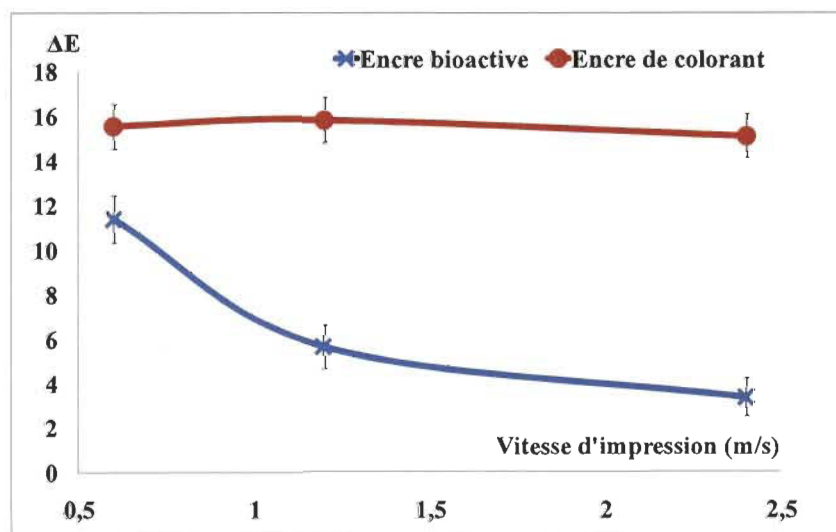


Figure 5-3 Effet de la vitesse de transfert sur la bioactivité du papier

Résistance des enzymes aux contraintes d'impression : pression d'impression

La pression d'impression dans la zone de pincement réduit la distance entre la zone de pincement, augmente le gradient de vitesse et augmente ainsi le taux de cisaillement.

La Figure 5-4 illustre l'effet de l'augmentation de la force d'impression sur les valeurs ΔE de l'encre bioactive à viscosité constante (50 mPa.s), à deux différentes vitesses d'impression. L'augmentation de la pression d'impression augmente la quantité de transfert d'encre en entraînant une plus grande compression de la feuille de papier, ce qui permet au papier de mieux aller chercher, d'aller puiser, la bioencre au fond des alvéoles. La densité en enzymes devrait donc augmenter. Les résultats démontrent un effet global positif de la pression d'impression sur la bioactivité des papiers, et un effet bénéfique de la pénétration des enzymes dans l'épaisseur du papier, dans les conditions expérimentales utilisées.

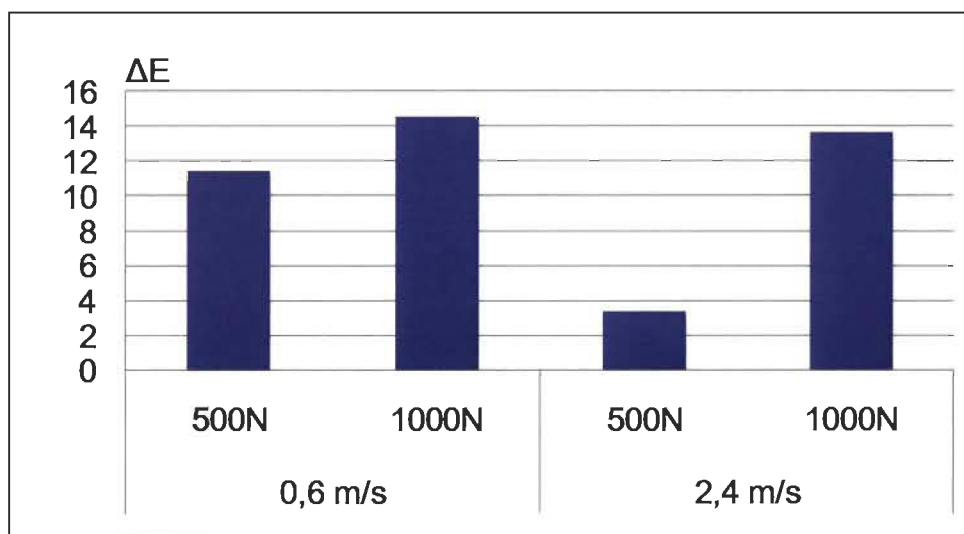


Figure 5-4 Effet de la pression d'impression sur la bioactivité du papier

Étude du temps de stockage de la bioencre

Les résultats de conservation de la bioencre à base d'enzymes sont illustrés à la Figure 5-5 qui représente la réponse colorimétrique des papiers bioactifs selon le temps de vieillissement et l'environnement de stockage de la bioencre. Le ΔE représente la différence de couleur entre le papier non imprimé et le papier imprimé et révélé.

Les résultats démontrent que la conservation de la bioencre tout comme le conditionnement de l'enzyme sont meilleurs à l'obscurité, à 5°C et 90% HR. Au bout de six jours (144 heures), la bioencre conditionnée à 23°C, 50% HR n'est plus utilisable : celle-ci donne une différence de couleur à peine perceptible à l'œil, $\Delta E \approx 3$. La conservation en chambre froide, à l'abri de la lumière, améliore considérablement la durée valide d'utilisation de la bioencre.

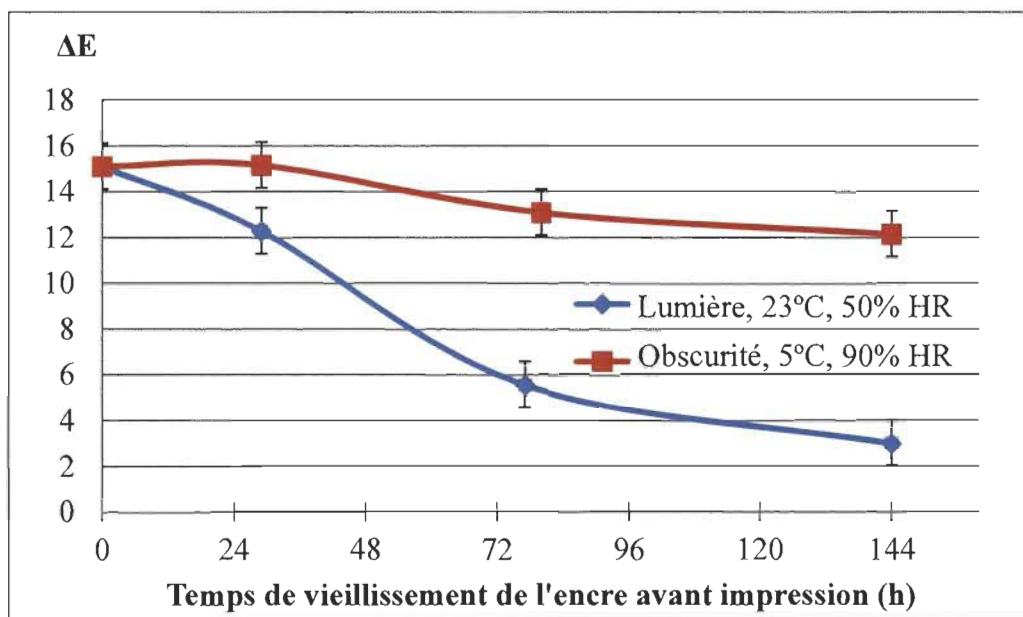


Figure 5-5 Réponse colorimétrique de la bioencre après révélation

La Figure 5-6 représente l'évolution temporelle de la couleur des papiers bioactifs imprimés, mais non utilisés, selon le temps et l'environnement de conditionnement des papiers imprimés. Lors du conditionnement des bandelettes de papier, une coloration verte peut apparaître, car l'oxygène de l'air agit comme un oxydant du chromogène ABTS. Une coloration verte apparaît donc petit à petit.

En conclusion, l'efficacité des papiers bioactifs à base d'enzymes est influencée par les conditions d'entreposage des papiers. Les résultats démontrent que la lumière accélère significativement l'oxydation de l'ABTS par le dioxygène et la dégradation de leur état avant utilisation, tandis que la température l'intensifie, mais dans une moindre mesure.

Pour fins expérimentales, nous évaluons l'efficacité des papiers bioactifs, immédiatement après fabrication, à 23°C et 50% d'humidité relative et à la lumière du jour, afin d'éliminer l'effet significatif des paramètres précédents sur la réponse de bioactivité des papiers.

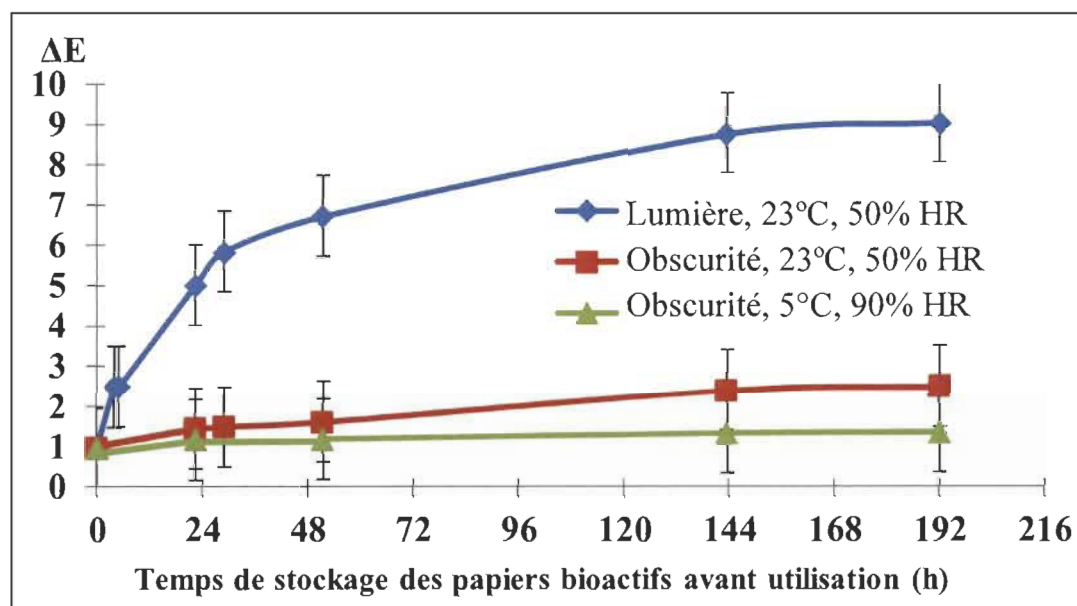


Figure 5-6 Influence des conditions de stockage pré-utilisation des papiers bioactifs

En conclusion, l'efficacité des papiers bioactifs à base d'enzymes est influencée par les conditions d'entreposage des papiers. Les résultats démontrent que la lumière accélère significativement l'oxydation de l'ABTS par le dioxygène et la dégradation de leur état avant utilisation, tandis que la température l'intensifie, mais dans une moindre mesure.

Pour fins expérimentales, nous évaluons l'efficacité des papiers bioactifs, immédiatement après fabrication, à 23°C et 50% d'humidité relative et à la lumière du jour, afin d'éliminer l'effet significatif des paramètres précédents sur la réponse de bioactivité des papiers.

5.2 Quantification de la bioactivité d'un papier bioactif à base de phages

Cette section présente la méthode développée pour la quantification de l'activité d'un papier bioactif à base de phage.

L'ajout d'un support papier peut influencer la nature des interactions entre les phages et les bactéries. Dès les premières étapes d'immobilisation des phages sur le papier, le substrat papier influence déjà la distribution, l'agrégation et la couverture des phages sur la surface du papier [224]. Lors de l'utilisation des papiers bioactifs, les propriétés du papier peuvent avoir des conséquences sur la bioactivité des phages immobilisés. Par exemple, la capillarité et la nature hydrophile du papier pourraient avoir un effet bénéfique de diffusion des bactéries facilitant leur contact avec les phages. La porosité et la structure tridimensionnelle du papier pourraient emprisonner les phages et les empêcher d'accéder à la surface extérieure au contact des bactéries. La détermination de l'efficacité du papier bioactif est donc une étape fondamentale et préliminaire à toutes les étapes expérimentales de développement d'une méthode de fabrication industrielle d'un nouveau papier bioactif. Le besoin d'une méthode robuste, fiable, efficace et rapide de quantification de l'activité de phages immobilisés sur un papier devient évident : une condition nécessaire de notre étude. Par ailleurs, cela démontre la nécessité de tester la bioactivité des papiers dans les conditions les plus représentatives d'un contact typique entre un papier d'emballage bioactif et des bactéries alimentaires. Cette hypothèse peut être analysée sous plusieurs aspects.

Les grands thèmes pertinents de cette analyse sont les mécanismes d'interaction entre les phages et les bactéries (2.3.4.1). Les éléments qui ne sont pas rapportés dans la littérature sont l'immobilisation de phages sur une structure papier, ainsi que l'influence du substrat papier, qui est le substrat utilisé dans notre étude, sur la partie bioactive des phages, *i.e.* la queue des phages. Selon notre revue de littérature [90], nous sommes les seuls à avoir publié (travaux relatifs à notre thèse [206]) sur le sujet de l'immobilisation physique des phages sur substrat papier, une autre publication portant sur l'utilisation de cellulose sous forme régénérée [105].

Les éléments rapportés dans la littérature sont la théorie et l'analyse des paramètres qui influencent les plaques de lyses bactériennes [225]. Les autres éléments de la littérature sont les méthodes traditionnelles en microbiologie introduites à la section 2.5.2.1. Cependant, la présence d'un support papier intermédiaire entre les phages et leur bactérie hôte limite l'exploitation directe de ces méthodes pour le développement de papier bioactif pour le contrôle de bactéries.

Les paramètres expérimentaux significatifs de l'utilisation des phages en milieu liquide permettent néanmoins d'anticiper, de déterminer et de contrôler les paramètres qui seraient potentiellement significatifs en présence d'un papier de base entre les phages et les bactéries, en plus de permettre d'éviter les sources d'erreurs expérimentales et la variabilité des résultats de zones de lyse. En substance, les paramètres les plus significatifs sont la quantité de bactéries, la qualité des bactéries, le rapport de multiplicité d'infection ou MOI (*multiplicity of infection*), la taille des phages, l'efficacité des phages, le taux de diffusion des phages, et l'environnement expérimental.

La taille des phages influence la taille de la zone de lyse [225]. Ce paramètre est maintenu constant dans le cas d'une utilisation exclusive du phage T4, mais devient significatif lorsqu'un cocktail de plusieurs phages serait éventuellement utilisé (travaux subséquents à cette thèse, notamment mémoire [226] de maîtrise UQTR de Zeinab Hamzeh). En conséquence, nous ne recommandons pas la comparaison directe de la taille de la zone de lyse de deux phages de tailles différentes. La taille du phage T4 utilisé est introduite à la section 2.3.4.1. La quantité de bactéries est contrôlée par le temps d'incubation des bactéries et par la méthode d'énumération décrite à l'Annexe 3. Après 18h de culture de la bactérie *E.coli* B à 37°C, la quantité de bactéries obtenue lors de la phase de croissance logarithmique est d'environ 10^8 ufc.mL⁻¹. L'utilisation de bactéries en phase de croissance logarithmique est par ailleurs conseillée [227].

La qualité des bactéries est contrôlée en appliquant les recommandations du protocole expérimental d'isolation et de stockage présentés à l'Annexe 3.

Le paramètre de multiplicité d'infection MOI est défini par Adams [228] comme étant le ratio de particules de phage adsorbées par bactérie dans une culture, ou le ratio de phage par bactérie lorsque les phages non adsorbés ne sont pas pris en considération [225].

Le taux de diffusion des phages est le paramètre le plus susceptible d'être influencé par le papier. À l'échelle du laboratoire, les propriétés de diffusion, notamment humidité, composition, viscosité, du milieu de culture bactérienne influence significativement le développement de la zone de lyse [225]. La diffusion des phages est influencée par les propriétés intrinsèques aux phages et par la densité d'agar. Une densité d'agar trop importante réduit la diffusion des phages et réduit la taille de la zone de lyse. La différence d'osmolarité entre l'agar de couche supérieure et l'agar de couche inférieure peut modifier la densité de la couche d'agar supérieur. Le séchage excessif de l'agar inférieur augmente la densité d'agar et induit un flux d'eau de l'agar supérieur vers l'agar inférieur, ce qui réduit la densité d'agar supérieur dans laquelle les phages diffusent, et réduit ainsi la taille de la zone de lyse [225]. Le séchage excessif de l'agar supérieur ou une épaisseur trop mince de la couche d'agar supérieure réduit la taille de la zone de lyse. La diffusion des phages dans l'agar inférieur est beaucoup plus lente que la diffusion dans la couche d'agar supérieure. Le poids moléculaire des préparations commerciales d'agar peut également influencer la taille de la zone de lyse, en offrant une gélification efficace de l'agar à une densité d'agar plus basse comparativement à une préparation d'agar standard. En définitive, le contrôle de la méthode de préparation de l'agar utilisé est indispensable pour écarter l'influence de la densité d'agar sur la quantification de la taille de la zone de lyse. Dans le cas d'une conception de papier emballage bioactif à base de bactériophages, le taux de diffusion des phages serait influencé par la matrice alimentaire et ses propriétés de viscosité, ce qui pourrait influencer significativement l'efficacité du papier bioactif.

La conception de la méthode de quantification de la bioactivité des phages sur le papier tient compte de tous les éléments rapportés dans la littérature, afin d'assurer une fiabilité et une reproductibilité des résultats expérimentaux en réduisant l'erreur expérimentale liée à la variation des paramètres qui influencent significativement la réponse de bioactivité des phages sur le papier.

La méthode consiste à soumettre le papier bioactif à un contexte d'utilisation qui se rapproche le plus possible du contexte d'utilisation finale, et consiste à simuler la présence de bactéries au contact du papier bioactif.

La quantification de la bioactivité revient à analyser la zone de lyse des bactéries au contact du papier bioactif. La zone de lyse, visible à l'œil nu, est un phénomène qui représente la migration des phages du papier vers l'extérieur, en suivant une direction perpendiculaire à la surface d'épaisseur du papier. L'expansion de la zone de lyse requiert un rendement suffisant de progénitures de phages à partir de chaque bactérie infectée pour permettre le développement d'une plage de lyse. La taille de la zone de lyse peut être caractérisée par son périmètre et son aire. Le périmètre de la zone de lyse a déjà fait l'objet d'études par Lee *et al.* [229, 230] pour la quantification de la variance du taux de croissance du périmètre de la zone de lyse, en termes de longueur de périmètre présentant de grandes ondulations, *i.e.* une déviation de la circularité des bords de la zone de lyse, dans l'objectif de caractériser le phénomène d'évolution des phages, *i.e.* la variance du génotype et du phénotype des phages dans une zone de lyse, et son influence sur la diffusion des phages. Nous en concluons que l'évolution des phages n'est pas uniforme le long du périmètre. De manière intéressante, les résultats de cette quantification [229, 230] ont été réalisés par caméra numérique, acquisition et analyse d'image par logiciel et par macro développée sur-mesure. Dans ce travail, la zone de lyse est quantifiée par l'aire de la zone de lyse. La qualité de la zone de lyse peut être caractérisée par son uniformité et par la caractérisation de la zone d'inhibition des bactéries et de la zone bactéricide. Les zones bactéricides et d'inhibition de bactéries sont les zones autour du papier bioactif ou respectivement, les bactéries sont complètement détruites et/ou incomplètement détruites. Dans ce travail, la zone de lyse quantifiée est la zone globale bactéricide et d'inhibition des bactéries, qui correspond à l'objectif de contrôle (*i.e.* une élimination non absolue) des bactéries présentes au contact du papier bioactif.

En conclusion, la méthode développée offre de nombreux critères de performance : spécificité, faible coût, acceptabilité par la communauté scientifique et facilité d'utilisation. Au besoin, les obstacles à contourner sont la sensibilité de la détection, la

spécificité lors d'une utilisation de cocktail de bactéries pathogènes différentes et la rapidité de bioactivité en conditions non optimales de température, pH, acidité, teneur en sel et matrices alimentaires. Enfin, la rapidité d'analyse des zones de lyses peut être améliorée par automatisation [121].

Les 13 étapes expérimentales de quantification de la bioactivité des papiers bioactifs à base de phages sont :

1. Incuber la bactérie hôte dans 5 mL de milieu TSB pendant une nuit (environ 18h) dans un incubateur à 37°C en agitation à 200 rpm.

La préparation de la surface contaminée par des bactéries consiste à inoculer les bactéries hôtes par étalement sur boîte de Petri par la méthode microbiologique [231]. La méthode de préparation des bactéries ciblées consiste à ajouter une colonie d'*E.coli* B à 4 mL de milieu de culture composé d'une suspension de TSB (bouillon caséine-soja). La culture bactérienne est incubée pendant 18h afin de permettre une croissance bactérienne de 10^8 ufc.mL⁻¹ (unité formant une colonie). De plus, un bouillon de gélose consistant en une suspension de 3% de poudre de TSB et de 0,5% de gélose en eau purifiée est préparé. Après ébullition du bouillon et équilibre à 52°C pendant 2h, une goutte (25 µl) de culture bactérienne est ajoutée à 3 mL de bouillon. Enfin, le mélange bouillon/bactéries est versé sur la couche de gélose TSA (gélose de soja tryptique) en boîtes de Petri.

2. Ajouter 5 mL de milieu semi-solide tempéré à 50°C à 200µl de la bactérie hôte. Mélanger délicatement pour former une suspension uniforme évitant la formation de bulles d'air. Doubler les volumes pour des duplicas de boîtes de Petri. Le milieu semi-solide - utilisé comme couche supérieure, appelée aussi couche top agar, contenant les bactéries à contrôler avec le papier bioactif - est préparé en ajoutant 0,5% d'agar (élément permettant la semi-solidification de la couche supérieure) au bouillon de TSB.

3. Ajouter à la surface de boîtes de Petri de TSA et laisser se solidifier durant 5 minutes.

4. Découper le papier bioactif fabriqué en disques de 6 mm ou de 2,54 cm de diamètre.

Les résultats de douze échantillons de disques bioactifs de 6mm de diamètres peuvent être obtenus avec une seule boîte de Petri. Cette rentabilisation de l'utilisation maximale de chaque boîte de Petri est un ingrédient clé pour augmenter considérablement le nombre de réponses expérimentales, dégager des résultats statistiquement satisfaisants, et isoler l'effet de l'erreur expérimentale liée à certains facteurs tels que l'uniformité des propriétés physiques du papier utilisé, et la densité de l'agar utilisé. La taille de 6mm de diamètre s'avère particulièrement intéressante à l'analyse par traitement d'image de la bioactivité des papiers à l'aide d'un stéréoscope. C'est aussi la taille de disque obtenu par les principales poinçonneuses manuelles papier.

Les disques mesurant 1 pouce (25,4 cm) de diamètre ont été principalement utilisés pour réduire l'erreur expérimentale probable lors de l'ajout d'une infime quantité de phages à la surface du papier, lors de l'étape d'étude de l'influence de l'humidité sur l'efficacité du papier bioactif, introduite à la section 4.2.6. La découpe circulaire des échantillons de papier bioactif permet une reproductibilité des résultats de quantification de la bioactivité, en supprimant les variations liées à l'effet de la taille et de la forme des papiers bioactifs. La forme circulaire permet aussi de vérifier l'uniformité symétrique souhaitable de la zone de lyse autour de la forme symétrique des disques de papiers bioactifs.

5. Transférer les disques de papiers bioactifs à la surface de la couche semi-solide en utilisant une pince stérile, de manière stérile à proximité d'un bec Bunsen pour éviter la contamination des boîtes de Petri.

6. Incuber pendant une nuit à 37°C pour la bactérie *E.coli* et 25°C pour la bactérie *Listéria* et *Salmonella*.

7. Mettre en place un dispositif pour prendre une photo de chaque disque de papier de manière à avoir une exposition verticale de l'objectif sur le disque de papier, une distance constante entre l'objectif et l'échantillon, et des conditions de luminosité suffisantes pour distinguer le contraste entre l'aire de la zone de lyse et la surface semi-solide turbide. Le dispositif doit également permettre de photographier des disques de papiers bioactifs ayant de larges zones de lyse.

8. Prendre des photos de chaque échantillon en utilisant le dispositif précédent.
9. Étalonner l'image à l'aide du logiciel en mesurant les pixels correspondants au diamètre des disques d'échantillons.
10. Appliquer des macros de traitement d'image à chaque image (tâche automatisée avec Photoshop) pour faciliter l'exécution de l'étape suivante.
11. Sélectionner de manière semi-automatique l'aire de la zone de lyse en utilisant l'outil de sélection rapide de Photoshop CS3 pour une reproductibilité des sélections et une réduction de l'erreur expérimentale.
12. Utiliser l'outil du logiciel pour compter le nombre de pixels de la zone de lyse et déduire la zone de lyse en mm^2 grâce à la calibration de l'étape 9.

La bioactivité des phages sur le papier est exprimée en l'aire de la zone de lyse A [mm^2]. De plus, puisque la bioactivité peut être influencée par la quantité de phages sur le papier, nous proposons une notion de bioactivité spécifique des phages sur le papier A_s soit l'aire de lyse A divisée par le grammage déposé, exprimée en [$\text{m}^4.\text{g}^{-1}$].

13. Exporter les résultats sous Microsoft Excel (ou similaire) pour permettre le calcul des moyennes de zones de lyse et les écarts type.

La méthode de quantification que nous proposons ci-dessus s'est avérée fiable pour nos objectifs de recherche après avoir déterminé et contrôlé les paramètres influençant significativement les résultats de quantification. Nous avons observé, ultérieurement à la section 2.5, que l'humidité du papier est un paramètre influençant significativement les résultats de la méthode de quantification développée. Le développement de cette méthode de quantification permet d'anticiper les paramètres significatifs qui vont aussi influencer l'efficacité du papier bioactif lors de son utilisation finale.

Parmi ces paramètres significatifs, nous comptons la matrice alimentaire, l'humidité du milieu de conditionnement. D'autres paramètres significatifs peuvent exister selon le cahier des charges d'utilisation finale d'un papier bioactif, notamment les aspects chimiques liés à la matrice alimentaire.

Il faut aussi considérer que d'autres paramètres pourraient être découverts lors de la mise à l'échelle industrielle de la fabrication d'un papier d'emballage bioactif. Comme axe de poursuite de ce travail, un plan d'expérience pourrait être utile pour quantifier les interactions qui existent entre les différents paramètres significatifs et pour évaluer les effets combinés des paramètres. Il faut aussi noter que cette méthode n'est pas transposable aux phages dont la bactérie hôte ne forme pas de tapis sur de l'agar solide, ni aux phages dont le rendement de progénitures est insuffisant pour former des plages visibles. La question qui demeure est la quantification de la bioactivité des papiers en conditions réelles de contact alimentaire. Pour cela, les papiers bioactifs devront être mis au contact d'un alimentaire solide, mélanger l'aliment à tester et le papier bioactif à l'aide d'un broyeur microbiologique, couramment appelé *Stomacher*, dans lequel 2 marteaux plats frappent alternativement l'échantillon contenu dans un sac polyéthylène stérile contre une paroi lisse. Le dénombrement des bactéries se fait ensuite à partir de la phase liquide [232]. Cependant, broyer les aliments avec le papier bioactif pour en évaluer l'efficacité est loin de représenter des conditions réelles d'utilisation. Pour raisons évidentes de temps et de l'étendue du travail considéré (ici hors sujet), l'influence de la matrice alimentaire qui pourrait interférer entre les bactéries et les phages, n'a pas été prise en compte, et la surface contaminée d'un aliment par un tapis de bactéries sur milieu de culture a été remplacée par un tapis de bactéries sur boîte de Petri. La préparation d'un aliment contaminé par des bactéries est une étape de validation de l'efficacité des papiers bioactifs en conditions réelles, dans le cadre de la poursuite du présent travail.

En guise de conclusion de la méthode développée pour la quantification de papier bioactif, quatre précisions doivent être apportées.

Premièrement, la visualisation des plages individuelles ne permet pas seulement d'énumérer les phages. Les plages de lyses sont à la base de l'isolation des phages, de la caractérisation des phages à partir de la morphologie de la plage de lyse selon que la lyse soit claire ou turbide, la taille de la plage, l'absence ou la présence d'un halo. Deuxièmement, la taille et la morphologie des plages de lyse peuvent être influencées par plusieurs facteurs tels que la taille des phages, la nature tempérée des phages ou

l'état de complétion de la lyse bactérienne. Troisièmement, la visibilité des plages de lyse pourrait être améliorée par l'ajout de colorants d'oxydoréduction au top agar à 50-300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ceci aurait pour effet qu'avec la croissance des bactéries, le colorant incolore et soluble serait réduit en rouge formazan insoluble, permettant l'amélioration de la visibilité des plages de lyse qui deviennent incolores sur un fond rouge [233]. Finalement, la taille des plages de lyse peut être améliorée par différents moyens tel que l'ajout d'azoture de sodium (NaN_3) accompagné d'une plus longue période d'incubation [234], une réduction de la concentration d'agar de 0,5% à 0,3%, une incubation anaérobie de 24 heures suivie d'une incubation aérobie de 16 heures [235].

5.3 Estimation de la résistance mécanique des agents bioactifs

Cette section présente les résultats de calcul des ordres de grandeur de la résistance mécanique des agents bioactifs aux contraintes de fabrication de papier bioactif. Ces calculs supportent les études de la résistance mécanique des enzymes (section 5.1) et des phages (section 5.4 et 5.6). Bien qu'il n'y ait pratiquement aucune évaluation réelle de la résistance mécanique d'agents bioactifs, notamment des phages, nous nous sommes intéressés à en calculer l'ordre de grandeur afin de comprendre si, d'un point de vue mécanique fondamentale, ces agents peuvent résister aux contraintes qui leur sont imposées.

La pression P exercée entre une pince d'impression est habituellement de l'ordre de $P \approx 1 \text{ MPa}$ [189] alors que le tenseur des contraintes de cisaillement σ_{ij} dépend du taux de cisaillement $\dot{\gamma}_{ij}$ et de la viscosité η de l'encre selon l'équation (2) où le taux de cisaillement $\dot{\gamma}_{ij} = (\partial v_i / \partial x_j + \partial v_j / \partial x_i)$ dépend des gradients de vitesse du fluide.

$$\sigma_{ij} = \eta(\dot{\gamma})\dot{\gamma}_{ij} \quad (2)$$

La rhéologie du fluide est incluse dans la dépendance au taux de cisaillement de la viscosité. Cependant, pour avoir un ordre de grandeur, le fluide est considéré comme newtonien (ce qui est probablement le cas pour nos solutions de phages).

Lors d'un transfert de fluide entre des pinces d'impression comme en couchage par rouleau, le taux de cisaillement peut être estimé par $\dot{\gamma} \approx U_0 / d$ [236] où U_0 est la vitesse du papier et d est la distance entre les rouleaux d'impression.

Pour une vitesse d'impression $U_0=1\text{m.s}^{-1}$ et $d=1\mu\text{m}$, le taux de cisaillement est environ de $\dot{\gamma}=10^6\text{s}^{-1}$ ce qui se traduit dans le cas de l'eau comme solvant par une contrainte $\sigma=1\text{kPa}$. Mais ceci n'est qu'une contrainte (une force par unité de surface).

Pour une longueur typique de biomolécule de 10nm , la force exercée sur celle-ci est:

$$f_{\sigma} = \sigma R_0^2 \approx 10^{-13} \text{ N} = 0,1\text{pN} \quad (3)$$

De même, la force exercée par une pression à la surface de la biomolécule est:

$$f_p = P R_0^2 \approx 10^{-10} \text{ N} = 100\text{pN} \quad (4)$$

Ces forces peuvent apparaître faibles, mais leur échelle est comparable aux forces typiquement nécessaires pour rompre les liaisons chimiques de molécules complexes [237].

Il est difficile d'estimer convenablement les taux de cisaillement qui ont lieu dans les procédés d'impression conventionnels tels que la gravure ou la flexographie. Cependant, ils doivent tout de même rester dans l'ordre de grandeur des estimations données par l'équation (3) et (4). Ainsi, nous en concluons avec une bonne approximation que si les forces exercées sur un phage (ou toute molécule bioactive de taille similaire) dans une pince d'impression sont grandes, elles ne sont pas trop grandes pour détériorer les fonctions biologiques des molécules bioactives.

Même si les agents bioactifs sont des protéines complexes, ils sont essentiellement formés de chaînes organiques analogues à des polymères. Les solutions diluées de polymères idéaux sont essentiellement caractérisées par leur rayon R_0 et la viscosité η du solvant.

La force $f(r)$ nécessaire à étirer le polymère par une distance r peut être calculée selon [238] l'équation (5), où T est la température et $k_B=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ est la constante de Boltzmann.

$$f(r) \approx 3 \frac{k_B T}{R_0^2} r \quad (5)$$

Considérant la biomolécule dans de l'eau, $R_0 \approx 5 \text{ nm}$ pour une viscosité $\eta = 10^{-3} \text{ Pa.s}$. La force nécessaire à étirer le polymère par une distance R_0 est donc $f(R_0) \approx 5 \text{ pN}$, ce qui est à l'échelle des forces exercées par la presse d'impression.

En outre, le temps de relaxation ou temps nécessaire pour retrouver la forme d'équilibre d'une chaîne de polymère idéale est défini [238] selon l'équation (6) :

$$\tau \approx \frac{\eta R_0^3}{k_B T} \quad (6)$$

Pour les mêmes paramètres de calculs de force, le temps de relaxation est de $\tau \approx 0,1 \mu\text{s}$. Lorsque comparé aux taux de cisaillement, le produit $\dot{\gamma} \tau \approx 0,1$, ceci signifie que la pince exerce seulement une faible perturbation [238] sur les biomolécules, probablement insuffisante pour détériorer leurs fonctions biologiques.

5.4 Résistance des phages aux contraintes d'impression gravure

Cette section présente et analyse les résultats du plan expérimental décrit à la section 4.2.4 (Étape 4 – Étude de la résistance des phages aux contraintes d'impression gravure : vitesse et pression).

Considérant la caractérisation du transfert d'encre avec l'impression gravure, la Figure 5-7 illustre le profil tridimensionnel de surface du cylindre d'impression utilisé, obtenu par un profilomètre optique Wyko NT1100. Le cylindre d'impression utilisé présente une couverture d'impression de 42%, un rayon d'alvéole de $95 \mu\text{m}$ et une profondeur de $29 \mu\text{m}$.

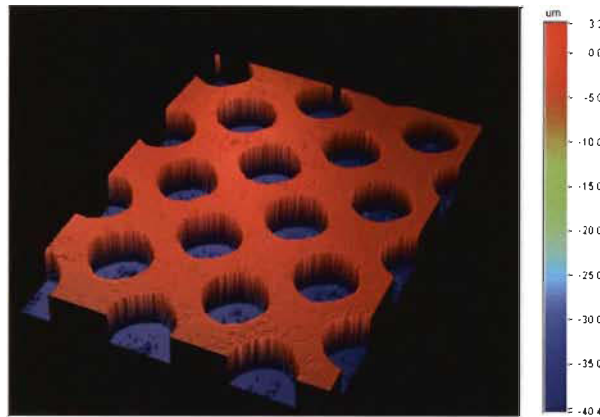


Figure 5-7 Profil tridimensionnel de surface du cylindre d'impression utilisé

La caractérisation du transfert d'encre est évaluée en ajoutant un colorant à la bioencre et en enregistrant le changement de couleur du papier imprimé au moyen du spectrophotomètre (3.2.2). Les résultats [201] présentés à la Figure 5-8 montrent essentiellement qu'une augmentation de la vitesse d'impression de $0,2 \text{ m.s}^{-1}$ à 2 m.s^{-1} n'affecte pas significativement le taux de transfert d'encre, tandis que la Figure 5-9 montre qu'une augmentation de la force d'impression de 100N à 300N tend à augmenter le taux de transfert d'encre sur le papier [239].

La quantification de la bioactivité des papiers est réalisée selon la méthode présentée à la section 4.2.2 et développée à la section 5.2. La Figure 5-10 illustre l'application de la méthode. L'image a) de la Figure 5-10 montre les disques de papiers bioactifs au-dessus du tapis bactérien, avant l'incubation de la boîte de Petri. L'image b) de la Figure 5-10 correspond à l'évaluation qualitative de la bioactivité des phages, après incubation, à l'aide du microscope stéréoscopique. Les zones qui présentent une activité bactérienne sont visuellement turbides, et peuvent donc être différenciées des zones transparentes dans lesquelles les phages ont détruit les bactéries. L'aire des zones transparentes peut être mesurée à l'aide d'analyse d'image en utilisant Adobe Photoshop CS3. L'image c) de la Figure 5-10 est le résultat du traitement d'image, de la sélection de la zone de lyse, et de la mesure de l'aire (en mm^2) de la zone de lyse transparente (tableau inséré en bas de l'image de droite). La section 5.2 fournit plus de détails sur l'utilisation de l'aire de la zone de lyse comme unité de mesure de la bioactivité des phages immobilisés sur le papier.

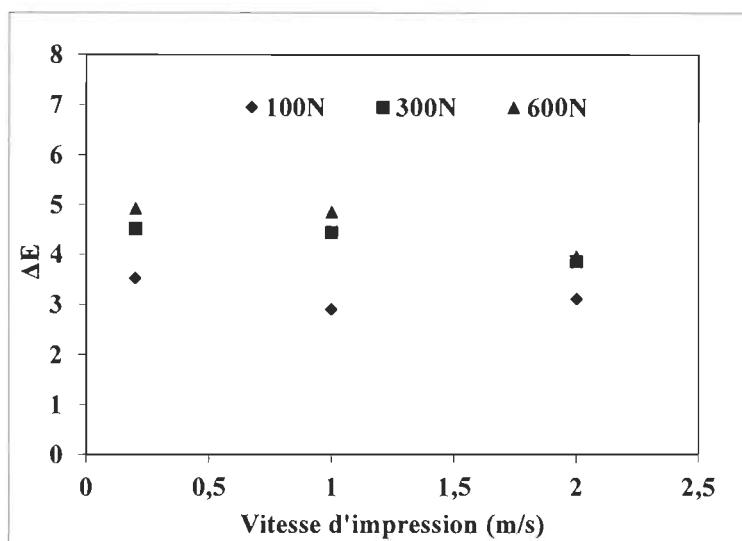


Figure 5-8 Caractérisation du transfert d'encre selon la vitesse d'impression

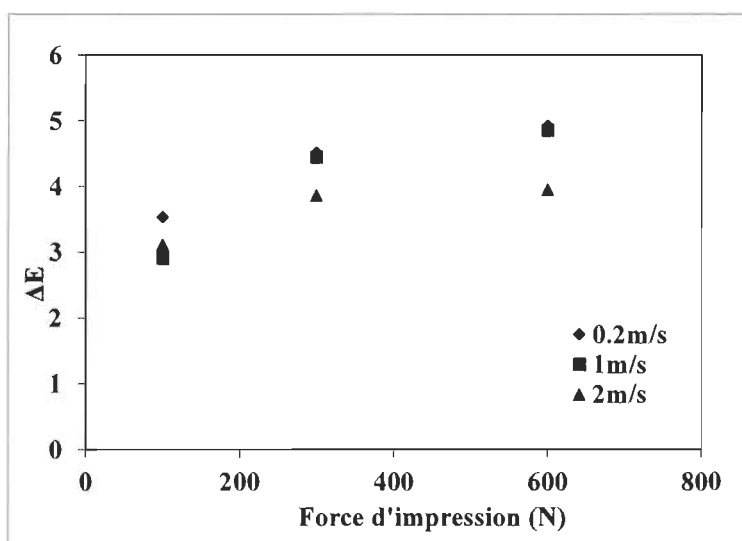


Figure 5-9 Caractérisation du transfert d'encre selon la force d'impression



Figure 5-10 Résultats de la quantification de la bioactivité des phages imprimés

La quantité de phages déposés sur le papier a certainement un effet sur la bioactivité du papier. Pour estimer cet effet, il est pratique d'utiliser l'aire spécifique de la zone de lyse, équation (7), où β est le grammage sec de la bioencre. Puisque le grammage est habituellement mesuré en $[g.m^{-2}]$, l'unité de l'aire spécifique de la zone de lyse est donc en $[m^4.g^{-1}]$.

$$A_s = \frac{A}{\beta} \quad (7)$$

Les résultats de l'étude de l'influence de la vitesse d'impression sur la bioactivité des phages sont obtenus selon le plan expérimental section 4.2.1 (Étape 1 – Formulation d'une bioencre à base de phages et l'imprimer sur papier) et section 5.2 (Quantification de la bioactivité d'un papier bioactif à base de phages). La Figure 5-11 montre que les phages restent bioactifs et ne sont pas affectés par une augmentation du taux de cisaillement associé à une augmentation de la vitesse d'impression.

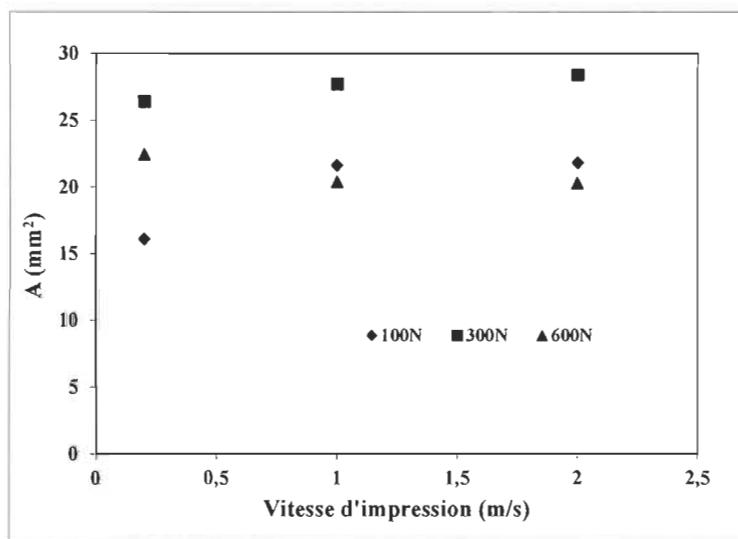


Figure 5-11 Influence de la vitesse d'impression sur la bioactivité des papiers

En revanche, la Figure 5-12 montre que les forces d'impression élevées (entre 300N et 600N), donc la pression d'impression, réduisent la bioactivité des papiers, malgré une augmentation du taux de transfert de la bioencre. La cause en est probablement la pénétration accrue de la bioencre dans la porosité du papier. Les phages inclus dans la porosité sont sous la surface du papier et donc inaptes à contacter les bactéries.

Une augmentation du transfert d'encre n'est donc pas équivalente à une meilleure bioactivité finale du papier.

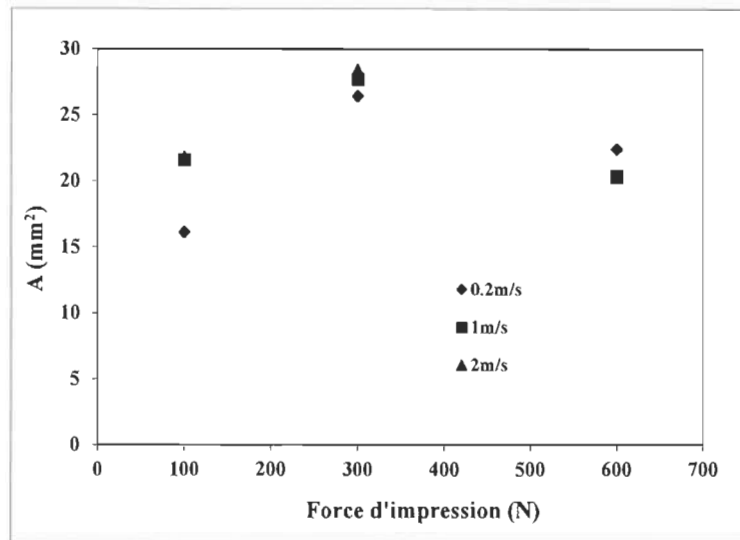


Figure 5-12 Influence de la force d'impression sur la bioactivité des papiers

5.5 Influence de l'humidité du papier bioactif à base de phages

Cette section décrit et analyse les résultats du plan expérimental décrit à la section 4.2.6 (Étape 6 – Étude de l'influence de l'humidité sur l'efficacité des papiers bioactifs).

Au cours des expériences de test d'impression des papiers bioactifs à base de phages, nous avons réalisé que l'humidité ambiante, et donc le délai Δt avant la mise en contact du papier bioactif avec les colonies de bactéries, influence significativement les résultats de bioactivité des papier. Pour les besoins de l'étude, les papiers bioactifs sont conditionnés à 90% d'humidité relative. Leur utilisation est effectuée à 30% d'humidité relative. Il y a donc une chute du taux d'humidité du papier pendant cet intervalle de temps.

Nous avons donc été amenés à étudier l'influence du temps Δt sur la bioactivité de phages imprimés par héliogravure selon la méthode décrite à la section 3.3.3 (Impression gravure d'enzymes et de phages).

Nous avons ensuite enregistré la bioactivité des phages en fonction du délai Δt entre la sortie du papier bioactif de l'environnement initial contrôlé à 90% d'humidité relative et le contact du papier avec les colonies bactériennes. Les résultats illustrés à la Figure 5-13 montrent que la bioactivité des phages se maintient et est stable durant l'intervalle Δt inférieure à 5 minutes. Après ce délai, nous observons une réduction drastique de l'infectivité de bactéries. La bioactivité du papier devient nulle après des délais d'attente Δt supérieurs à 8 minutes. Le taux d'humidité du papier après un délai d'attente de 8 minutes est de 5% (mesuré en tant que ratio entre le poids de l'échantillon papier et le poids sec de ce même échantillon).

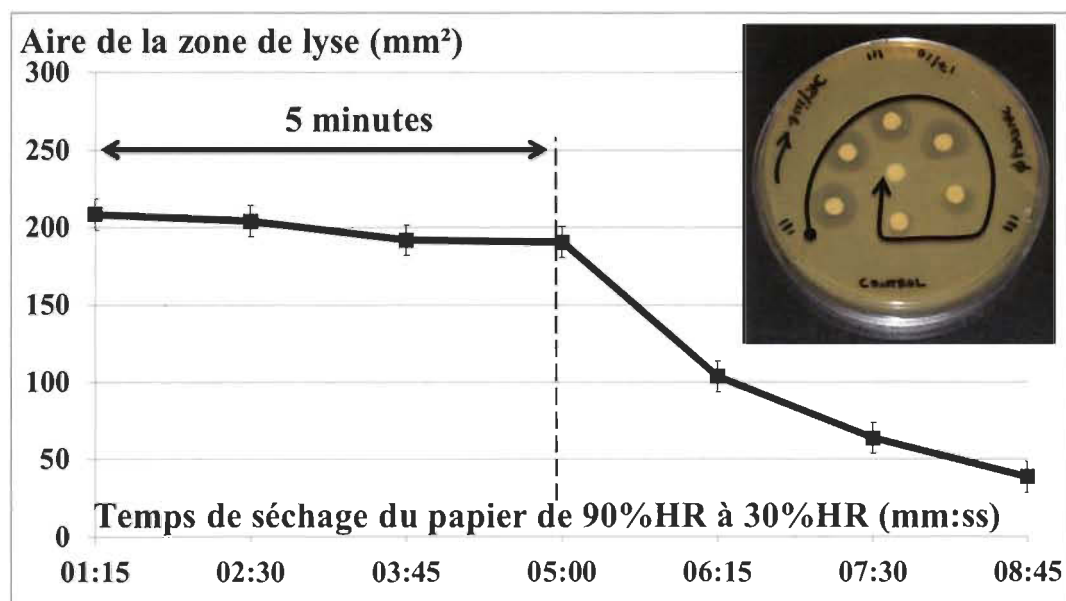


Figure 5-13 Effet significatif de l'humidité sur l'efficacité des papiers bioactifs

L'effet de l'humidité des papiers bioactifs sur leur efficacité peut être davantage quantifié en considérant le séchage du papier. La Figure 5-14 montre l'influence du temps de séchage sur la bioactivité de solutions de phages imprégnées sur le papier avec la méthode décrite à la section 3.3.10. L'axe horizontal représente le pourcentage d'humidité contenue dans le papier (poids eau/poids papier sec). L'axe vertical représente l'activité des phages exprimée en aire de zone de lyse A (mm²) pour les deux papiers pulvérisés avec des solutions de 10^7 phages.mL⁻¹ (points rouges) et 10^9 phages.mL⁻¹ (points bleus).

Ces résultats montrent que la baisse du taux d'humidité pendant l'utilisation des papiers bioactifs inhibe l'infectivité des phages. La possibilité pour que les phages deviennent à nouveau bioactifs lorsque les papiers sont remouillés existe. Nous l'avons étudiée. Des échantillons de papier qui ont été laissés sécher pendant une période plus longue que 5 minutes à 30% d'humidité relative ont été réhumidifiés avec 10 μ l d'eau physiologique stérile (solution stérile contenant 9 g de chlorure de sodium par 1000 mL d'eau distillée), et incubés à 37°C pendant une nuit. Les résultats illustrés à la Figure 5-15 [207], montrent que la zone de lyse autour des échantillons confirme que les phages redeviennent actifs après la réhumidification des papiers.

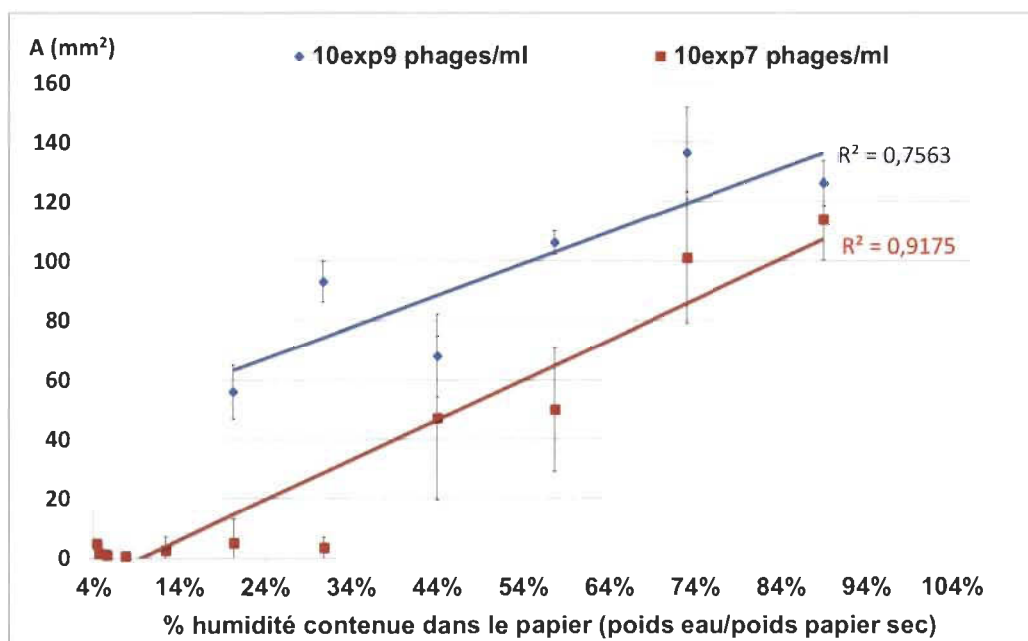


Figure 5-14 Influence du temps de séchage sur la bioactivité des phages sur papier



Figure 5-15 Réactivation des papiers bioactifs après leur remouillage

Le phénomène de réhumidification du papier a été davantage quantifié en faisant subir des papiers bioactifs à base de phages à plusieurs cycles d'humidité. La méthode expérimentale consiste à pulvériser une solution de phages de 10^7 ufp.mL⁻¹ sur un papier non couché de 35 g.m⁻² de grammage. La quantité totale de solution pulvérisée est de 40 g.m⁻². Le papier est alors séché dans un environnement contrôlé à 52% d'humidité relative et à une température de 21°C, avant d'être remouillé avec une pulvérisation de 40 g.m⁻² d'eau stérilisée. Nous observons ensuite la bioactivité des papiers pendant quatre cycles consécutifs.

La Figure 5-16 montre le pourcentage d'humidité contenue dans le papier mesurée par rapport au poids du papier (axe vertical de gauche) ainsi que la bioactivité des papiers (axe vertical de droite) mesurée avec l'aire de la zone de lyse. Le papier bioactif imprégné avec des phages à 140% d'humidité est d'abord séché pendant une heure. Après une heure, le papier est réhumidifié avec de l'eau stérile et séché à nouveau. Le cycle est ainsi répété deux autres fois, avec une mesure de la bioactivité à chaque cinq minutes, dans des conditions contrôlées à 52% d'humidité relative et 21°C.

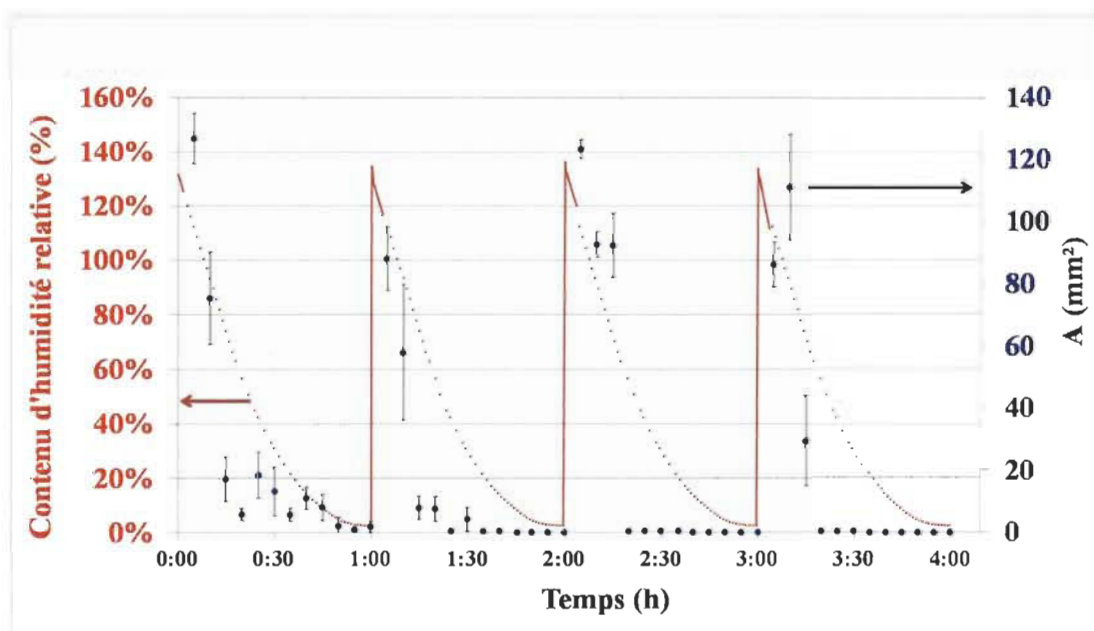


Figure 5-16 Influence de la réhumidification du papier sur l'activité des phages

La Figure 5-16 montre que la bioactivité du papier peut être presque complètement réactivée ou rétablie avec le remouillage du papier.

Cependant, la baisse de la bioactivité semble être plus abrupte avec chaque cycle de séchage/réhumidification. Nous soupçonnons que le mouillage répétitif des papiers bioactifs fait pénétrer les phages à l'intérieur de la structure de fibres, soit en dessous de la surface du papier.

Nous avons quantifié la réactivation des phages par réhumidification des papiers dans le but de pallier à l'effet dommageable de l'entreposage à long terme et du séchage subséquent du papier. Bien que l'expérience précédente montre que la bioactivité se rétablit lors d'une réhumidification du papier, telle qu'elle pourrait s'observer avec des aliments humides, nous avons proposé ci-après une solution plus permanente. L'utilisation de gélatine comme agent de rétention d'humidité est la deuxième solution proposée [201]. La Figure 5-21 présentée à la section 5.6 montre l'effet bénéfique de l'utilisation de la gélatine sur la durée de conservation de papiers bioactifs fabriqués par couchage à lame. Nous y démontrons que lors du couchage à grande vitesse d'un mélange de phages et de gélatine, les phages peuvent aussi résister au séchage infrarouge à haute intensité associé au procédé de couchage. La gélatine permet aussi d'atténuer l'effet de décroissance rapide de l'humidité du papier bioactif dans le temps, lorsque celui-ci est stocké en conditions d'humidité ambiante.

Lorsque les phages sont strictement utilisés en milieu liquide, l'effet d'un environnement sec ne se pose pas. Lorsque les études [106, 223] de développement de papiers bioactifs ne dépassent pas l'échelle du laboratoire, peu d'attention est portée aux contraintes d'application commerciale et aux conditions d'utilisation finales du papier bioactif. Les résultats obtenus ici, ainsi que la méthode pour y arriver sont une contribution originale [207] à l'influence du séchage et de la conservation à plus long terme du papier sur la bioactivité des phages T4 utilisés. L'effet significatif de réduction de bioactivité que nous avons montré lors du séchage du papier est également important pour d'autres phages, et devra théoriquement être reproduit dans le cadre de développement de papier bioactif, notamment pour les phages EcoM-AG2, SboM-AG3, LinM-AG8 spécifiques respectivement aux bactéries pathogènes *E.coli* O126:H8, *Shigella boydii* et *Listeria innocua* [240].

L'effet de la réhumidification du papier sur sa réactivation est quant à elle d'un grand intérêt pratique, notamment pour que l'emballage bioactif soit efficacement emballé avant d'être utilisé, ainsi que pour que l'emballage bioactif soit utilisé dans un environnement humide.

5.6 Résistance des phages aux contraintes de couchage

Cette section présente et analyse les résultats du plan expérimental décrit à la section 4.2.5 (Étape 5 – Étude de la résistance des phages aux contraintes de couchage à lame: vitesse et pression).

La Figure 5-17 relie la bioactivité des papiers immédiatement après leur couchage à l'espacement entre le papier et la lame docteur. Cet espacement permet de contrôler la pression de la lame et, dans une certaine mesure, le transfert de la sauce de couchage au papier.

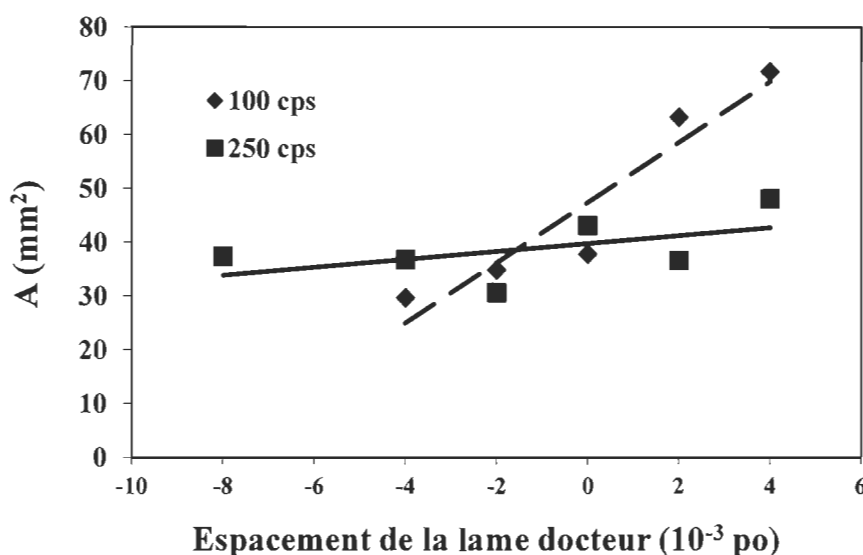


Figure 5-17 Influence de la pression de la lame de couchage sur la bioactivité

Une augmentation générale de la bioactivité avec l'augmentation de l'espacement de la lame docteur, soit lors d'une réduction de la pression de la lame, est d'abord observée.

Cette augmentation de la bioactivité peut découler soit d'une augmentation du poids de couche parce que plus de phages sont alors déposés à la surface qu'en profondeur du papier soit d'une augmentation de la survie des phages au couchage provenant d'une pression réduite de la lame de couchage.

Le facteur de poids de couche peut être isolé en utilisant l'aire spécifique de zone de lyse (équation (7)), tel qu'illustré à la Figure 5-18. Le regroupement des données sur une seule courbe implique que la viscosité n'a aucun effet sur la bioactivité autrement qu'en fixant le poids de couche, *i.e.* l'augmentation des contraintes de cisaillement résultant d'une plus grande viscosité n'est pas nuisible à l'efficacité des phages. La forme de la courbe, montrant une plus grande aire spécifique de zone de lyse à des faibles poids de couches, indique que ce n'est pas la totalité des phages déposés sur le papier qui participent à la destruction des bactéries. À un taux de diffusion de phages constant et à une croissance bactérienne constante, l'augmentation de la quantité de phages a peu d'effet sur la croissance de la plage de lyse bactérienne [241]. Ces données confirment, que ce sont les phages de surface et non le transfert total de phages qui est important. Cependant, les modificateurs de viscosité de la sauce de couchage, tels que la gélatine ou la CMC, peuvent avoir un effet sur la diffusion des phages et sur la croissance de bactéries.

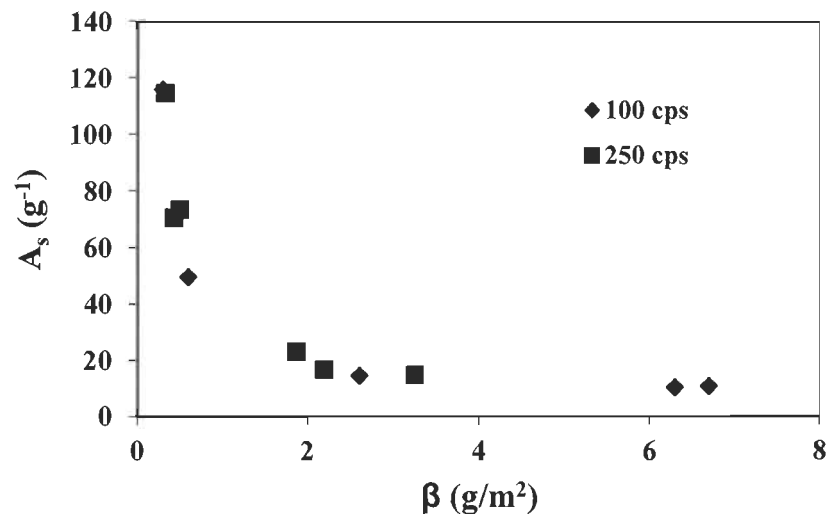


Figure 5-18 Influence de la viscosité et du grammage sur la bioactivité spécifique

L'influence de la vitesse de couchage sur la bioactivité des papiers est illustrée à la Figure 5-19. L'espacement de la lame docteur est réglé à 0 et la bioactivité du papier est mesurée immédiatement après le couchage. L'aire de la zone de lyse à la Figure 5-19 affiche une légère diminution avec la vitesse de couchage. Il est cependant apparent que les vitesses de couchage élevées, jusqu'à $600 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$, n'ont pas compromis de manière appréciable la bioactivité des phages.

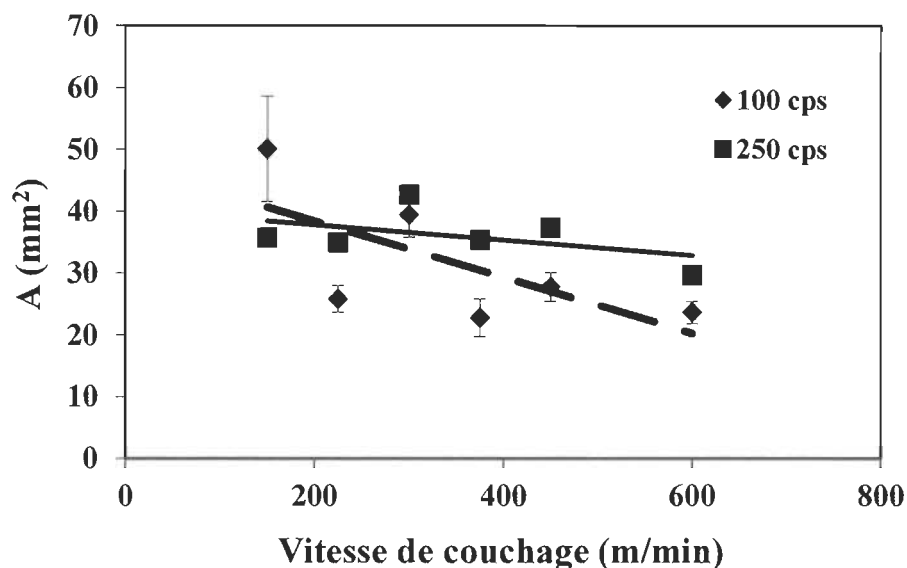


Figure 5-19 Influence de la vitesse de couchage sur la bioactivité des papiers

La variation de la viscosité de la sauce de couchage de 100 mPa.s à 250 mPa.s n'a pas eu d'effet significatif sur la bioactivité du papier, comme cela est montré par l'aire spécifique de la zone de lyse à la Figure 5-20. Comme la modification de la viscosité de la couche a été réalisée exclusivement grâce à l'addition de CMC, nous pouvons conclure que le CMC permet d'optimiser le taux de transfert de la sauce de couchage sur le papier sans influencer l'effet de la sauce de couchage. Le CMC peut donc être utilisé comme modificateur de viscosité sans que celui-ci n'interfère significativement avec la mobilité et l'efficacité des phages dans la structure de la gélatine. Cependant, la gélatine est alors le véritable véhicule de transport et d'immobilisation de phages. Une modification de la viscosité de la gélatine agirait sur la structure de la gélatine en modifiant la mobilité des molécules de collagène dans le liquide [242].

La modification de la structure de la gélatine influencerait donc la nature d'immobilisation des phages dans le gel, particulièrement lors de la formation du gel au contact du papier lorsque la solution de gélatine est refroidie, et lorsque les molécules mobiles s'agrègent en petits groupes de plus en plus grands, sous l'influence des interactions hydrophobes et électrostatiques [242], jusqu'à former un gel. Les futurs travaux d'utilisation de la gélatine devraient donc se poursuivre en isolant l'effet de la modification de la viscosité de la gélatine et de la structure de la gélatine sur l'efficacité des phages immobilisés dans la structure du gel.

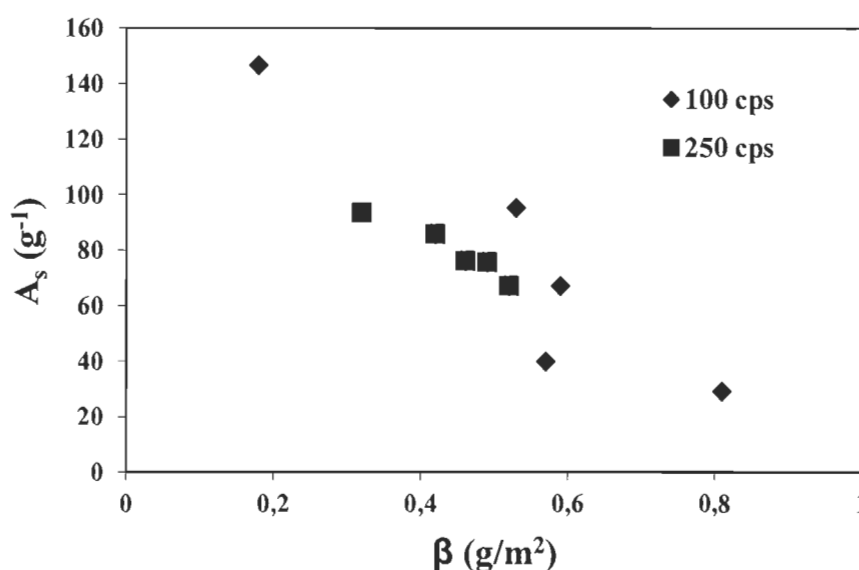


Figure 5-20 Influence de la viscosité et du grammage sur la bioactivité spécifique

Les résultats de la section 5.5 ont montré que le séchage des papiers bioactifs a un effet significativement négatif sur la bioactivité des phages sur le papier. Dans cette étude, la gélatine est principalement utilisée pour ses nombreuses propriétés physico-chimiques et parce qu'elle apporte une humidification de longue durée à l'environnement des phages.

L'influence du temps d'entreposage sur l'efficacité de papiers bioactifs couchés à 600 m.min⁻¹, pour 2 espacements de lame docteur, est illustrée à la Figure 5-21. Le conditionnement est réalisé à température ambiante, dans l'obscurité, sans contrôle d'humidité.

Les résultats montrent clairement que les papiers bioactifs à base de phages et de gélatine peuvent retenir leur activité pendant une période de plusieurs jours. De plus, l'augmentation du poids de couche, obtenu en utilisant un espacement de lame de 4 au lieu de -2, augmente la durée de conservation de la bioactivité des papiers.

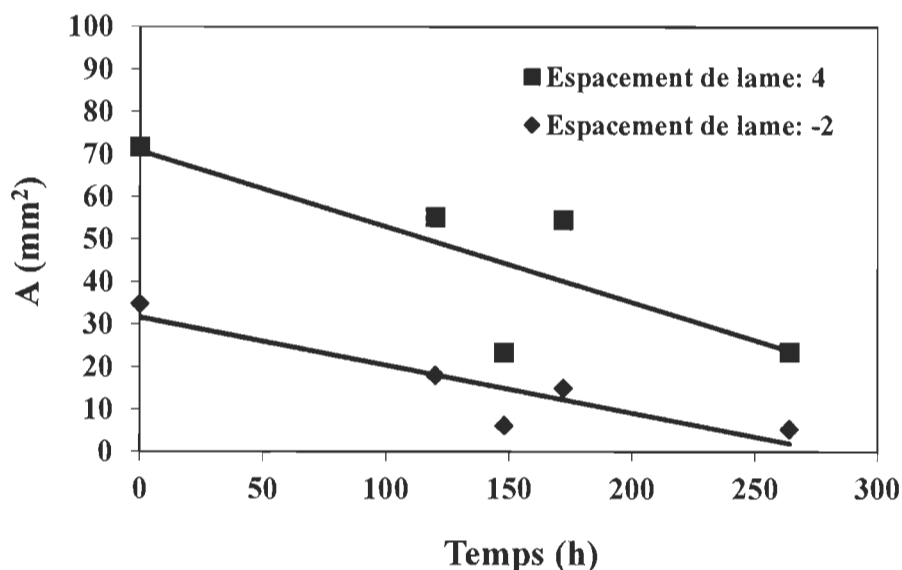


Figure 5-21 Décroissance de la bioactivité en fonction du temps

5.7 Discussion de l'influence de la gélatine sur l'efficacité des papiers bioactifs

En présence d'eau, la gélatine devient un hydrocolloïde [243] ayant deux types de propriétés fonctionnelles, soit la gélification et la capacité de former une matrice poreuse autour des phages pour faciliter la diffusion des phages vers les bactéries. La première propriété fonctionnelle pour laquelle nous avons utilisé la gélatine est la capacité de la gélatine à offrir un environnement de phages qui soit humide et qui réduise, voire qui élimine le taux d'humidité minimal de l'aliment emballé pour que les phages soient et demeurent efficaces. En fait, la gélatine séchée à l'air contient typiquement entre 8 et 12% d'eau [243]. Cette quantité d'eau fournie, même lorsque la couche de gélatine est séchée, correspond à la quantité d'humidité additionnelle minimale entre 5 et 10% (voir Figure 5-16, entre min 15 et min 45) dont le papier bioactif a besoin pour amorcer une bioactivité rapide, indépendamment du taux d'humidité de l'aliment emballé.

D'autre part, la gélatine peut soit absorber, soit dégager de l'humidité, en fonction de l'humidité de l'air environnant [243]. Cela implique une recommandation pour que le papier bioactif soit emballé, dans un environnement barrière à la vapeur d'eau, qui garantirait une humidité de la couche de gélatine pouvant facilement dépasser 12%, avant l'utilisation des papiers sur un aliment très sec. La littérature [243] rapporte qu'un taux d'humidité de gélatine supérieure à 16% peut occasionner une croissance bactérienne, auquel cas cela aurait un effet indésirable sur le papier bioactif. En absence d'emballage barrière du papier bioactif, son coût additionnel est évité, et c'est l'humidité -supposément élevée- de l'aliment qui serait absorbée par la couche de gélatine. Un flux d'humidité de l'aliment vers le papier remédierait à l'influence négative du séchage du papier, tandis qu'un flux d'humidité du papier vers l'aliment permettrait une diffusion des phages de la surface du papier vers l'aliment.

L'eau se conserve dans la gélatine parce que les molécules d'eau sont prises dans le réseau tridimensionnel de la gélatine, en développant des liaisons physiques, soit liaisons hydrogène, avec les parties polaires carboxyles ($-\text{COOH}$), hydroxyles ($-\text{OH}$) et groupements amines ($-\text{NH}_2$) de certains acides aminés hydrophiles qui composent le collagène.

La Figure 5-22 et la Figure 5-23 représentent des essais de mélange des phages avec de la gélatine de type A (cationique) et de type B (anionique) à différentes concentrations (5%, 9% et 13%). La gélatine est appliquée par simple déposition de goutte sur des disques de papier. Les papiers sont séchés à environ 21°C et à 30%HR pendant plusieurs jours, avant d'être testés pour le contrôle de bactéries.

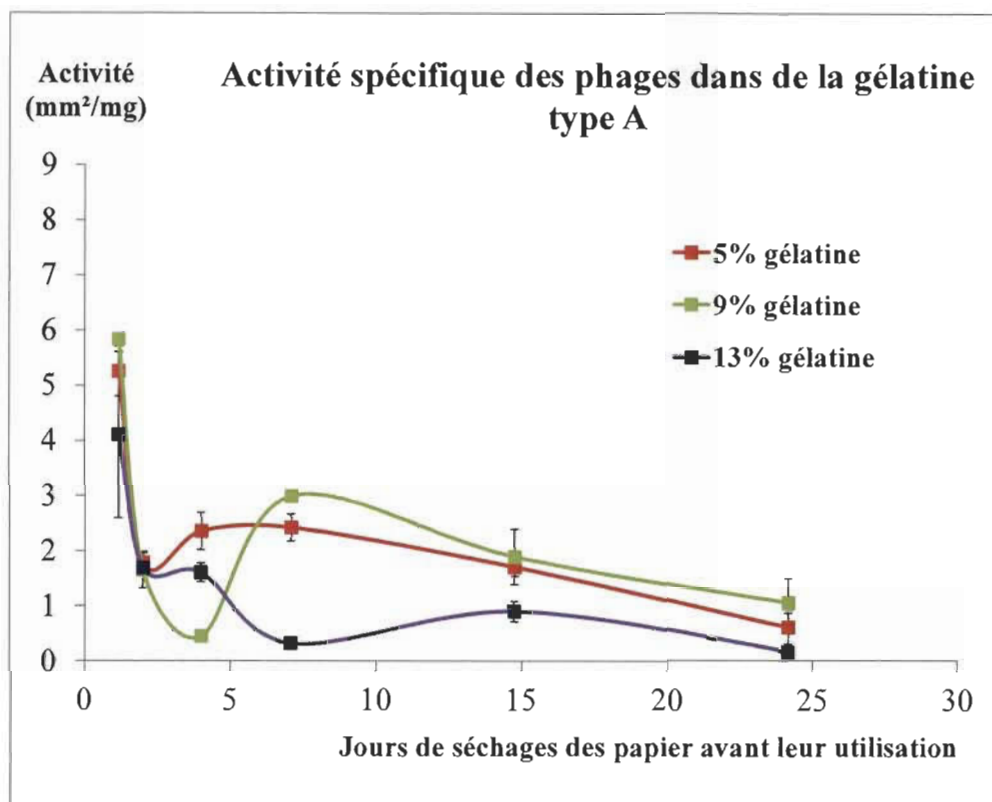


Figure 5-22 Dépôt de goutte de phages mélangés à de la gélatine de type A

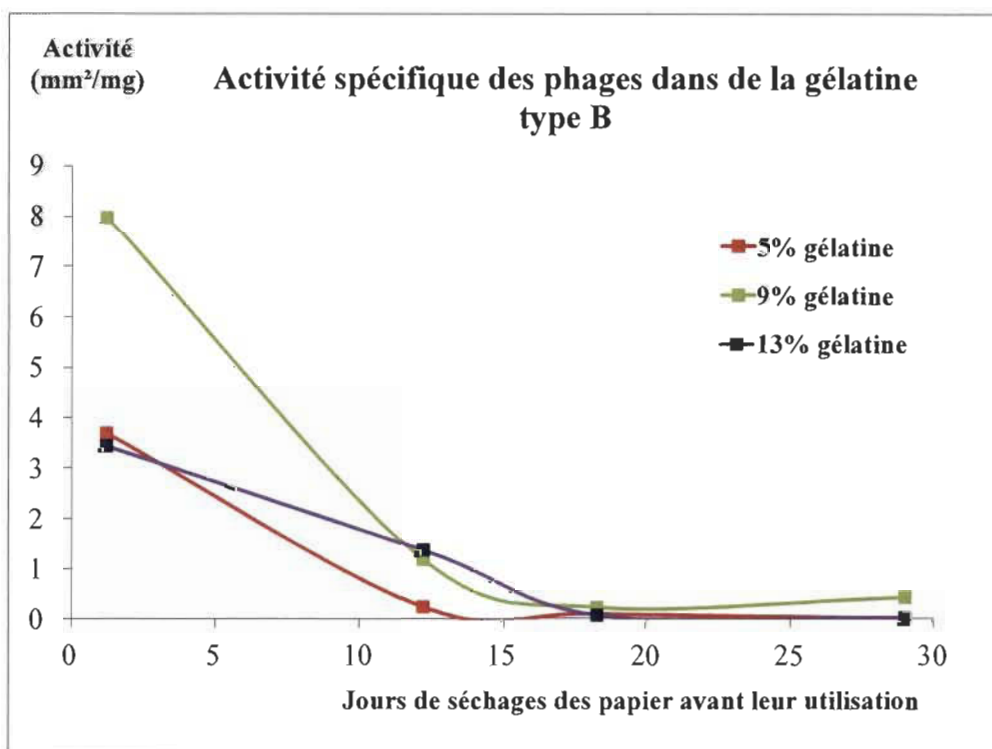


Figure 5-23 Dépôt de goutte de phages mélangés à de la gélatine de type B

Ces essais ont tout d'abord démontré la biocompatibilité des phages et leur viabilité, lorsque les phages sont immobilisés à l'intérieur du réseau tridimensionnel de la gélatine. De plus, la gélatine permet d'obtenir une très lente perte d'activité des papiers et une plus longue conservation de la bioactivité des papiers, de l'ordre du mois : les papiers ayant perdu 83% de leur activité au bout de trois semaines avec cependant une bioactivité rémanente satisfaisante.

De manière qualitative, les résultats de bioactivité des papiers en fonction du temps de conditionnement, illustrés dans la Figure 5-22 et la Figure 5-23 traduisent le changement observé des aspects des zones de lyse bactérienne avec le temps : les zones de lyse deviennent segmentées, comme si le rayon d'action des phages diminuait. La variabilité de la bioactivité des papiers est due à la difficulté de contrôler le poids de la couche, déposée par goutte, à cause des difficultés de manipulation induites par la gélification de la gélatine au moment du dépôt.

Les essais préliminaires de déposition de goutte ont aussi montré que la bioactivité des phages est légèrement supérieure lorsque les phages sont mélangés à de la gélatine cationique de type A (Figure 5-22), comparativement à l'utilisation de gélatine anionique de type B (Figure 5-23). Le point isoélectrique de la gélatine de type A (gélatine obtenue par traitement à l'acide) est de pH 8-9, comparativement à pH 4,8-5,5 pour la gélatine de type B (gélatine obtenue par traitement à l'alcali), signifiant qu'au pH 7 utilisé, la gélatine de type A est cationique, tandis que la gélatine type B est anionique. L'avantage d'utiliser de la gélatine cationique est en adéquation avec les résultats, présentés à la section 5.8, qui montrent l'influence de la charge électrostatique cationique sur la bioactivité des phages. Par ailleurs, la littérature rapporte l'effet connu du pH de la gélatine sur les interactions entre la gélatine et les autres composants d'une formulation donnée [242]. La différence de distribution des molécules entre les deux gélatines peut contribuer à la différence en efficacité des deux gélatines : la gélatine de type B contient un pic de poids moléculaires autour de $100\,000\text{ g.mol}^{-1}$ (connus sous le nom de microgels), tandis que la gélatine de type A contient une distribution plus large des poids moléculaires des composants de la gélatine [243].

L'avantage substantiel de l'utilisation de la gélatine dans le cadre de la fabrication d'emballages bioactifs alimentaires est lié à ses propriétés particulièrement intéressantes.

D'un point de vue physico-chimique, la gélatine est un mélange de chaînes de polymères de différentes longueurs qui forme une solution colloïdale aussi appelée *sol* (pour solution) qui, en refroidissant se transforme en gel et en se réchauffant redevient *sol*, et ceci de manière réversible [242] via le procédé appelé sol-gel [244]. La structure du gel formé par la gélatine provient de la structure du collagène de type A, à la base de la gélatine que nous utilisons, dont la structure est linéaire et ressemble à des fibres. Il existe 4 niveaux de structuration du collagène, de la séquence au repliement : la structure moléculaire primaire⁶¹ est composée de trois chaînes alpha dont deux sont identiques (alpha 1) et une légèrement différente (alpha 2). La structure moléculaire secondaire⁶² du collagène est telle que chaque chaîne alpha est enroulée en une hélice d'environ trois acides aminés par tour. La structure tertiaire⁶³ du collagène est un entortillement des trois chaînes alpha pour former une super hélice qui ressemble à une corde rigide, et qui mesure 300 nm de long pour un diamètre de 1,5 nm. La structure quaternaire⁶⁴ du collagène est telle que les structures de base sont espacées entre elles d'environ 75 nm à cause des distributions de charge [243].

L'espacement à l'intérieur de la structure tridimensionnelle du collagène est du même ordre de grandeur de la taille des phages T4 que nous utilisons, soit 200 nm de hauteur pour 20 nm de diamètre (section 2.3.4.1). La structure du collagène est donc particulièrement adaptée pour loger des phages T4, qui sont parmi les plus grands phages, mais aussi des phages de plus petite taille. Les phages emprisonnés de manière efficace dans la structure de la gélatine, avec l'aide des forces électrostatiques impliquées dans la formation du gel, peuvent diffuser vers l'aliment et rencontrer les bactéries qui y sont présentes, avec l'aide de l'eau contenue dans la gélatine.

⁶¹ Succession linéaire des acides aminés sans référence à une configuration spatiale.

⁶² Repliement local de la chaîne principale du collagène.

⁶³ Structure tridimensionnelle du collagène.

⁶⁴ Liaisons inter-chaînes non covalentes.

L'utilisation de la gélatine à la surface des papiers bioactifs permet aussi de protéger mécaniquement les phages des contraintes mécaniques environnantes. Cette propriété de protection mécanique offerte par la gélatine est d'ailleurs exploitée pour la finition de la surface des jeux de cartes en papier ou pour la restauration de livres anciens [242].

La gélatine a une propriété de protection colloïdale qui consiste à empêcher l'agrégation de particules et de cristaux et à stabiliser une suspension hétérogène [243]. La gélatine est plus efficace, et plus économique que les hydrocolloïdes disponibles tels que l'amidon (500 fois plus efficace) et la gomme arabique (200 fois plus efficace) [243], pour prévenir l'agglomération d'une solution fixative de formol. Cette propriété est déjà exploitée dans le couchage d'émulsions photographiques ou dans la fabrication de crème glacée. De manière semblable, la gélatine apporte donc une protection colloïdale des phages en suspension dans la sauce de couchage bioactive, empêchant les phages de s'agglomérer, et offrant une meilleure distribution des phages sur la surface du papier.

La capacité de moussage de la gélatine est une propriété de surface qui est due au fait que certains acides aminés du collagène sont hydrophiles et que certains acides aminés sont hydrophobes et tendent à migrer vers les surfaces, réduisant la tension de surface à l'interface air/liquide [243]. Dans notre cas d'application, cette propriété de surface de la gélatine permet de former une matrice poreuse autour des phages qui facilite la diffusion des phages de l'emballage vers les bactéries présentes dans l'aliment emballé. Par ailleurs, c'est la propriété de moussage de la gélatine qui est responsable de la combustion de la tête d'allumette composée de gélatine [242]. Lors des étapes de transfert technologique, l'application de la gélatine sur le papier constitue donc un compromis entre l'avantage indéniable du moussage de la gélatine sur les propriétés de surface et sur la porosité de la couche bioactive, et la difficulté technique additionnelle qui est occasionnée par le transport de mousse, quoique microscopique, sur le papier. Notons que la formation de la mousse est considérablement influencée par le pH [242].

L'adhésion et la cohésion sont d'autres propriétés que nous recherchons pour le papier bioactif. Le mot collagène (à la base de la gélatine) dérive du mot grec pour colle.

La gélatine est un liant de sauce de couchage utilisé pour la fabrication de papier jet d'encre. Elle garantit un séchage plus rapide de l'encre imprimée et une impression mécaniquement très stable, avec une augmentation significative de la densité de toutes les couleurs, et ce, de manière économique par rapport à l'utilisation de pigments plus dispendieux [242]. L'adhésion des phages sur la gélatine intervient lorsque la gélatine couvre entièrement le contour de la surface des phages, tandis que la cohésion de la gélatine sur le papier a lieu lorsque la couche bioactive de gélatine commence à se gélifier en refroidissant sur le support papier poreux sur lequel elle est appliquée.

L'ajout de gélatine incorporée dans une couche bioactive permet d'une part de réduire la perméabilité gazeuse de l'emballage bioactif, de manière similaire à la propriété barrière obtenue avec l'ajout de film de gélatine/formaldéhyde à la surface d'emballages de polyéthylène [242]. D'autre part, l'ajout de gélatine au papier déjà biodégradable continue d'offrir la biodégradabilité complète de l'emballage alimentaire ainsi traité. En effet, des films transparents d'emballage alimentaire complètement biodégradables peuvent être fabriqués à partir de films de gélatine durcis [245] et la gélatine technique est déjà utilisée comme collant pour les annuaires téléphoniques et les catalogues notamment pour ses propriétés biodégradables [242]. Les propriétés de barrière à la graisse de la gélatine modifiée [242] peuvent offrir une propriété barrière à la graisse à l'emballage bioactif alimentaire. L'utilisation de la gélatine devient ainsi une alternative durable à la propriété de barrière à la graisse des emballages des aliments prêts-à-la-consommation obtenue par le couchage de télomères fluorés [246]. Ces derniers sont graduellement remplacés par les grands fabricants agroalimentaires, [247] car ils se transforment en acides carboxyliques perfluorés, tels que le PFOA, potentiellement cancérigène [248], lorsqu'ils sont relargués notamment par les sacs de maïs à éclater destinés au four à microondes [249].

5.8 Influence d'une précouche cationique sur la bioactivité des papiers

Les résultats précédents ont démontré la résistance des phages aux contraintes de fabrication. Cependant, la distribution des phages sur le papier peut influencer la manière dont les virus s'assemblent sur le papier.

Dans cette étape, nous évaluons l'influence de la densité de charge cationique d'une précouche cationique sur la bioactivité de phages appliqués en deuxième couche supérieure. Cette section décrit les résultats [206] du plan expérimental de la section 4.2.7 (Étape 7 – Étude de l'influence de la nature d'immobilisation des phages : utilisation d'une précouche cationique)

L'immobilisation de phages a d'abord été réalisée sur des précouches de PolyDADMAC de hautes densités de charges cationiques variant entre $11 \mu\text{eq.mL}^{-1}$ et $470 \mu\text{eq.mL}^{-1}$. La Figure 5-24 représente la bioactivité du papier en fonction de la densité de charge de la précouche cationique (section 3.3.9). L'intervalle de temps Δt (résultats section 5.5) n'a pas été contrôlé et a varié entre 1 et 12 minutes.

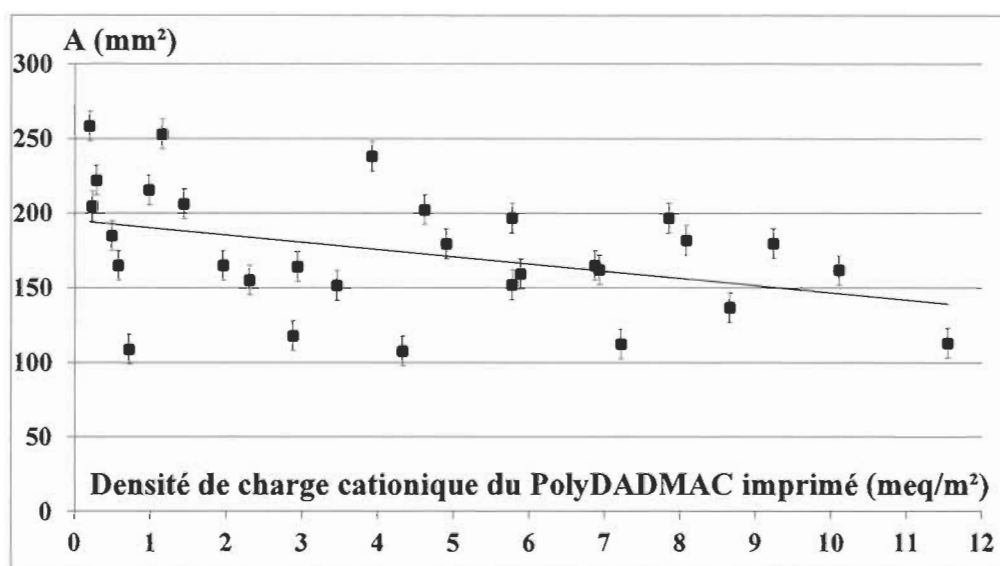


Figure 5-24 Bioactivité de phages sur précouche à haute densité de charge cationique

Malgré la large variabilité des résultats, il y a une tendance générale à la baisse vers une bioactivité réduite des phages au fur et à mesure de l'augmentation de la densité de charges cationiques. Ceci est *a priori* surprenant et inattendu, puisqu'une augmentation serait plutôt attendue, à cause de l'augmentation de l'attraction entre la tête anionique des phages et la surface cationique du papier.

L'effet du PolyDADMAC pourrait s'expliquer par l'effet d'encombrement stérique des polyélectrolytes et des phages à la surface du papier [250]. En effet, lorsque les polyélectrolytes tels que le PolyDADMAC sont utilisés pour stabiliser des nanoparticules tels que les phages, les polyélectrolytes combinent des effets de stabilisation électrostatique et stérique [251].

Le résultat, quelque peu inattendu, peut être expliqué par le fait que, au niveau microscopique d'intérêt (la taille des phages, 200 nm ou 0,2 μm), la surface du papier est rugueuse et non plane. La rugosité à l'échelle microscopique (3 μm et moins) et la surface spécifique même du papier rendent plus complexe l'immobilisation en surface des phages par rapport au substrat de polystyrène [107]. L'immobilisation des phages, à cause des sillons et crêtes qui composent en réalité la surface irrégulière du papier, n'est plus nécessairement perpendiculaire, mais à angle par rapport au plan de la surface du papier. L'effet de la rugosité pour obtenir une orientation perpendiculaire des phages à la surface géométrique du papier agit à l'encontre de l'effet positif de la surface spécifique du papier.

La baisse de la bioactivité pourrait aussi être reliée à une incompatibilité entre la plage de densités de charges de PolyDADMAC et la demande cationique de la solution de phages pour permettre l'orientation optimale des phages (tête « liée » à la surface du papier). Cependant, cette explication ne peut être retenue, car la densité de charges cationiques de la précouche de PolyDADMAC [14 – 1200 $\mu\text{eq.m}^{-2}$] (section 3.3.9) est 5 à 300 fois inférieure à la demande cationique des phages sur le papier de 5200 $\mu\text{eq.m}^{-2}$ (section 3.3.10).

La grande variabilité des résultats est probablement reliée à un paramètre expérimental non contrôlé, tel qu'une adhésion non spécifique des phages à la surface du papier, la variation du taux d'humidité du papier (section 5.5), la variation du taux de transfert de l'impression gravure à différentes viscosités, ou la variation biologique normale habituellement retrouvée lors des expériences de contrôle microbiologique [252].

Afin de réduire la dispersion des données, les expériences ont été répétées, en contrôlant le paramètre intervalle de temps Δt . Les résultats de la Figure 5-25 montrent une baisse significative de la variabilité des données pour chacun des intervalles de temps Δt [1-5 min], [6-9 min] et [9-12 min].

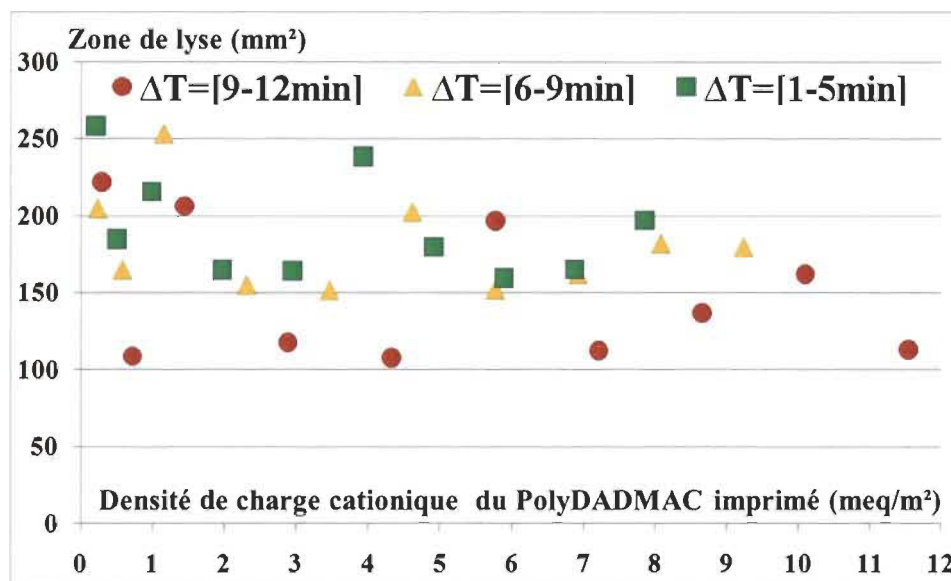


Figure 5-25 Bioactivité des phages immobilisés sur précouche hautement cationique

Dans le but d'améliorer le contrôle de la bioactivité des phages et de réduire la variabilité des résultats, la densité de charges cationiques de la précouche a été réduite, et les papiers ont été lavés pour enlever les phages non spécifiquement adsorbés à la surface du papier.

La Figure 5-26 démontre que l'augmentation de la densité de charges cationiques de 0 à 144 $\mu\text{eq.m}^{-2}$ résulte en une augmentation de la bioactivité des phages. Nous notons que les valeurs typiques d'aires de zone de lyse sont plus faibles que les valeurs présentées à la Figure 5-25 et Figure 5-26. Nous attribuons cela à l'effet du lavage du papier qui élimine les immobilisations non spécifiques des phages. Cependant, les phages ont maintenu une grande bioactivité au papier à cause d'une immobilisation efficace.

La Figure 5-26 montre également la bioactivité des phages en fonction de l'intervalle de temps Δt pour les différentes densités de charges cationiques. L'activité des phages immobilisés sur le substrat papier sans aucune précouche ($0 \mu\text{eq.m}^{-2}$) démontre l'effet de décroissance de l'humidité du papier sur l'efficacité du papier bioactif dans le temps, tel que cela a été démontré précédemment à la section 5.5.

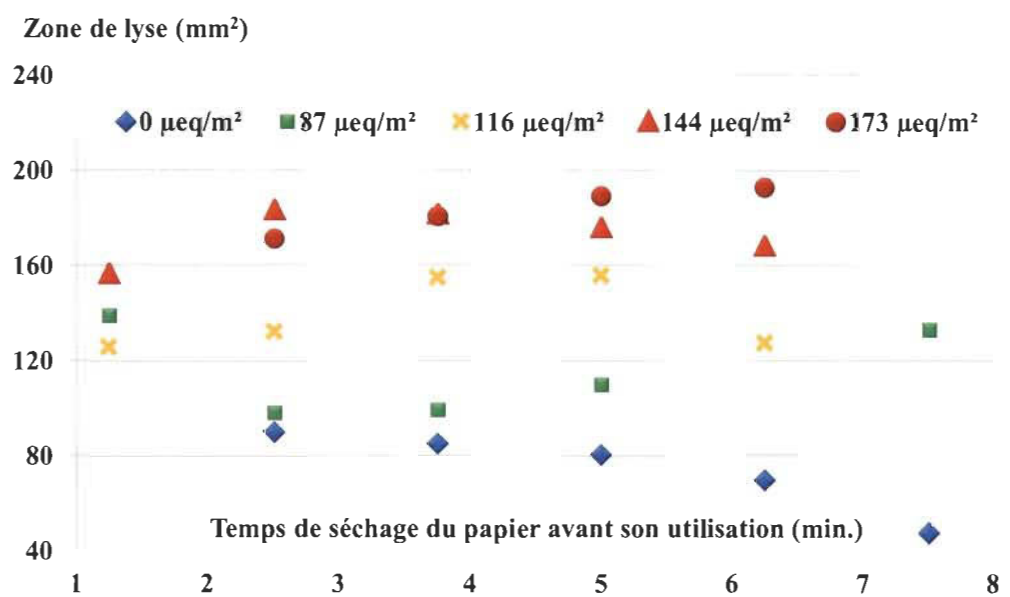


Figure 5-26 Bioactivité des phages immobilisés sur précouche légèrement cationique

Les résultats de cette étude démontrent donc l'effet positif d'une précouche de polyélectrolyte cationique sur la bioactivité des phages, mais surtout à faibles densités de charges cationiques. Le principal effet de la couche est d'augmenter l'orientation spatiale des phages perpendiculairement à la surface du papier. Cette optimisation est très importante parce qu'elle augmente l'infectivité des phages et la sensibilité du papier bioactif, ce qui accélère la destruction de pathogènes et/ou ralentit le développement des bactéries.

Bien que l'efficacité et la sensibilité de la méthode de fabrication avec précouche cationique puissent encore être optimisées, nous avons démontré qu'une précouche de polyélectrolyte cationique promeut la bioactivité des phages à la surface du papier.

À faible densité de charges cationiques, la bioactivité des phages est élevée et augmente avec la densité de charges jusqu'à une valeur optimale à $173 \mu\text{eq.m}^{-2}$, à partir de laquelle la bioactivité des phages atteint un plateau [206].

L'influence de la densité de charge cationique de la précouche s'explique par une influence sur l'agrégation des nanoparticules de phages T4, ainsi qu'un effet sur la couverture des phages sur la surface de la précouche cationique. Notre interprétation des résultats obtenus avec le papier rejoint l'analyse des résultats d'une étude comparable d'immobilisation de phages sur une surface aminosilanisée [224].

L'analyse des résultats se base sur les affinités entre la précouche de PolyDADMAC adsorbé à la surface du papier et les phages. D'une part, la surface de papier comprend des hydrogels de cellulose amorphe et d'hémicelluloses qui sont légèrement anioniques [90]. Le degré de cristallinité des fibres de cellulose est d'environ 50% [253], et ce sont seulement les zones amorphes de la cellulose qui gonflent en présence d'eau et qui sont susceptibles de réactions chimiques [90]. Lorsque le papier est mouillé par la précouche, seules les molécules cationiques telles que le polyélectrolyte PolyDADMAC (section 3.1.8) ont une forte tendance à s'adsorber sur la surface inaltérée des fibres mouillées de cellulose [216]. D'autre part, la charge électrostatique globale des phages (incluant la tête des phages) est négative, selon une étude publiée en 1978 par Serwer *et al.* portant sur le phage T7, un phage similaire au phage T4, tandis que la charge électrostatique de la partie bioactive des phages, *i.e.* les fibrines des phages est légèrement cationique [254]. Les composants majeurs des protéines de la capsid du phage T4 ont un point isoélectrique entre les deux pKa 4.8 et 6.2 [255, 256] signifiant que la tête des phages possède une charge nette négative au-delà de ce pH. La revue de littérature sur l'exploitation de l'énergie électrostatique pour immobiliser des phages sur une surface en est visiblement à ses premiers balbutiements. Les premières études d'assemblage et d'organisation de têtes de phages T4 sur une surface en verre aminosilanisée ont été obtenues en 2009 [224] grâce à des images topographiques, en utilisant la microscopie à force atomique. Cette étude [224] confirme la charge anionique nette globale des phages et de tous les virus, avec un point isoélectrique global (pKa) du phage T4 d'environ 4.

5.9 Influence de la porosité du papier sur l'efficacité des papiers bioactifs

Les matériels choisis et les méthodes développées dans les chapitres précédents sont ici utilisés afin d'étudier l'influence de la porosité sur l'efficacité du papier bioactif. Cette section présente et analyse les résultats [208] du plan expérimental de la section 4.2.8.

La Figure 5-27 [208] montre les résultats du taux de transfert d'encre imprimée sur les papiers à humidité contrôlée R0 à R5. En plus de la diminution attendue du transfert d'encre avec l'augmentation de la vitesse d'impression et la diminution de la pression, le taux de transfert d'encre augmente avec la perméabilité à l'air du papier. Sous les mêmes conditions d'impression choisies, une structure plus ouverte du papier permet une plus grande prise et une plus grande rétention d'encre, ce qui devrait se traduire par une amélioration de l'application de phages sur le papier.

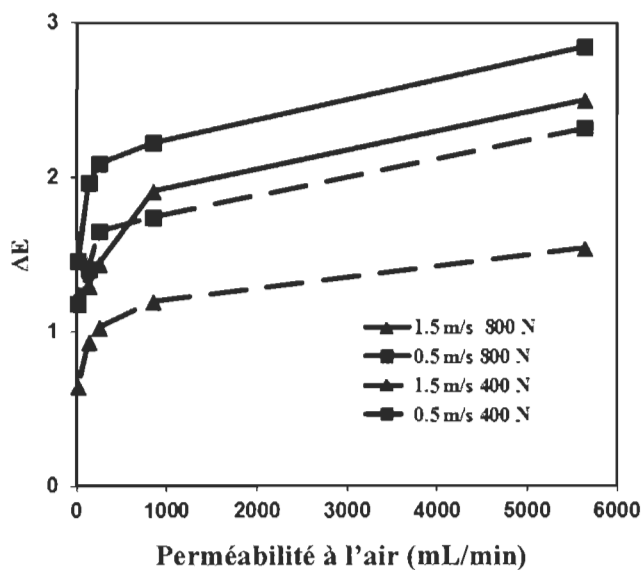


Figure 5-27 Caractéristiques de transfert d'encre des papiers R0 à R5

La méthode de quantification de la bioactivité des papiers bioactifs à base de phages à partir de l'aire de la zone de lyse est introduite à la section 5.2. Le bien-fondé et la fiabilité de cette méthode est illustrée à la Figure 5-28 qui montre la bioactivité de papiers bioactifs à différentes perméabilités à l'air, en fonction de la quantité de phages déposés sur les papiers.

La Figure 5-28 présente les zones de lyse obtenues avec des papiers de base ayant $5635 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et $11 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de perméabilité à l'air, formés respectivement des pâtes R0 et R4. Les échantillons de papier sont imprégnés de solutions de phages de $80 \mu\text{l}$ à des concentrations variant de 10^4 à $10^9 \text{ ufp} \cdot \text{mL}^{-1}$, et incubés pendant 12h. Pour s'adapter aux besoins de l'étude, les zones de lyse sont mesurées autour d'échantillons circulaires de 2,54 cm de diamètre, découpés des papiers formés par formette dynamique.

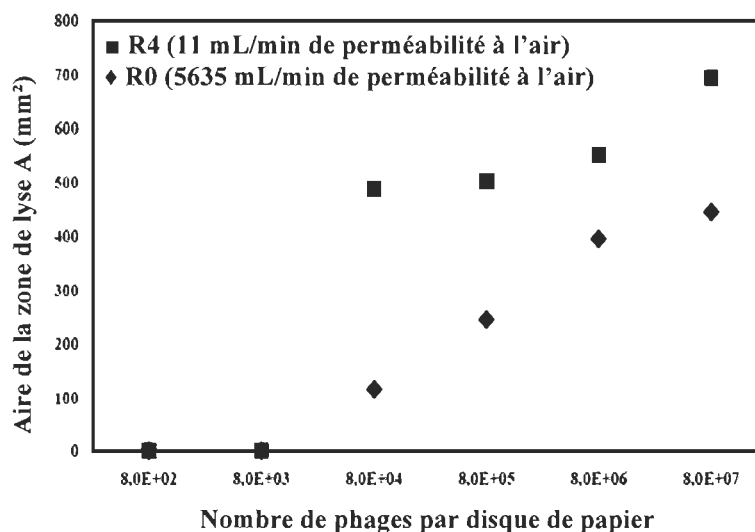


Figure 5-28 Bioactivité des papiers en fonction du nombre de phages déposés

La Figure 5-28 montre clairement que l'augmentation du nombre de phages sur le papier conduit à une augmentation de la zone de lyse, *i.e.* une augmentation de la bioactivité du papier. Cela confirme également qu'une concentration minimale de phages est nécessaire pour que la bioactivité des phages sur le papier puisse être détectée avec la mesure de la zone de lyse. La Figure démontre aussi clairement que la structure du papier, tel qu'indiquée par la perméabilité à l'air, a une influence sur l'aire de la zone de lyse : la structure ouverte du papier R0 avec une grande perméabilité à l'air produit une plus petite zone de lyse que le papier R4 avec une petite perméabilité à l'air, *i.e.* avec une structure plus fermée. L'effet est vraisemblablement dû à la différence en concentration de phages à la surface du papier. En effet, les phages ont tendance à pénétrer dans la masse de la structure des papiers ayant des perméabilités à l'air élevées, mais vont se concentrer principalement à la surface de papiers avec une faible perméabilité à l'air : c'est un effet de structure de surface ou de porosité de surface.

À concentration et volume égaux, il y a plus de phages à la surface du papier qui peuvent infecter des bactéries pour les papiers avec une faible perméabilité à l'air comparativement à des papiers avec une grande perméabilité à l'air.

Les résultats illustrés à la Figure 5-29 montrent que la bioactivité du papier décroît drastiquement avec l'augmentation de la perméabilité à l'air du papier, malgré l'augmentation du taux de transfert d'encre montrée à la Figure 5-27.

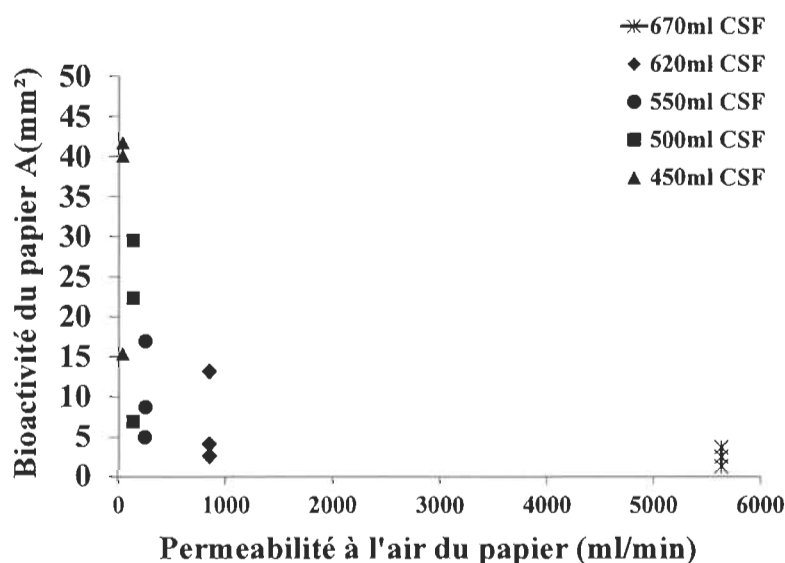


Figure 5-29 Influence de la perméabilité à l'air du papier sur la bioactivité

Ces résultats confirment notre hypothèse qu'une structure de papier plus fermée, obtenue à travers le raffinage de fibres, maintient les phages à la surface du papier, ce qui rend la bioactivité du papier plus efficace. La porosité du papier est donc un facteur significatif lors du développement d'un papier bioactif à base de phages. L'uniformité de la porosité d'un même papier de base a moins d'impact sur la bioactivité des papiers que l'utilisation de deux papiers ayant des porosités significativement différentes telle qu'un papier à base de pâte 100% NBSK raffinée à 550 mL de CSF et un papier à base de pâte raffinée 100% NBSK à 450 mL de CSF. L'optimisation de la porosité du papier de base pour la fabrication de papier bioactif doit s'accompagner d'une étude technicoéconomique pour trouver le compromis entre le coût énergétique additionnel de raffinage de la pâte et la qualité d'immobilisation des phages sur le papier, obtenue avec une structure de papier plus fermée [208].

Chapitre 6 - Conclusions

6.1 Conclusions générales

En premier, la faisabilité de développement et de fabrication économiques à grande échelle d'emballages bioactifs pour le contrôle de contaminations alimentaires a été établie. De plus, notre travail a contribué à répondre à plusieurs questions, certaines d'ordre pratique, d'autres fondamentales, sur les paramètres de fabrication, des domaines jusqu'à présent inexplorés.

L'aspect pratique qui a guidé ces travaux de doctorat est essentiellement lié aux considérations commerciales et industrielles de la fabrication de papiers bioactifs à grande échelle : soit les critères de performance de bioactivité, de coût, de toxicité, de biocompatibilité, de respect des réglementations de contact alimentaire et de fragilité des agents bioactifs aux contraintes de fabrication et de séchage.

Nous avons montré que les bactériophages s'avèrent des agents bioactifs à la fois pertinents et efficaces à cause de leur résistance et de leur facilité d'utilisation dans la fabrication de papiers bioactifs pour le contrôle ciblé de bactéries. Pour les applications de détection de bactéries, nos travaux préliminaires ont montré que les enzymes sont particulièrement prometteurs.

Par exemple, c'est la première fois que des bactériophages sont transférés à la surface d'un substrat papier, démontrant ainsi que des techniques d'impression et de couchage traditionnelles peuvent être utilisées pour la fabrication de papiers bioactifs. Nos résultats sont directement transférables au niveau industriel. C'est en ce sens qu'il est possible de conclure que la recherche menée dans le présent travail est pionnière et originale.

Méthode d'évaluation de la bioactivité des papiers bioactifs à base de phage

La littérature rapporte seulement des méthodes de quantification microbiologique ou moléculaire réalisées en milieu liquide.

L'une des conclusions majeures de ce travail est qu'une méthode de quantification originale et acceptée par la communauté scientifique que nous avons développée et proposée est maintenant disponible pour tester la bioactivité de papiers d'emballage bioactifs à base de phages en conditions représentatives de la présence de bactéries au contact des papiers bioactifs.

La découpe circulaire des papiers bioactifs avec une simple poinçonneuse manuelle papier permet d'obtenir des résultats fiables, reproductibles, pratiques et très faciles d'opération. L'indice qui permet de quantifier précisément l'efficacité des phages sur le papier à détruire les bactéries consiste simplement à mesurer l'aire circulaire de la zone de lyse des bactéries au contact des papiers bioactifs placé sur boîte de Petri. Nous avons clairement montré que l'augmentation du nombre de phages sur le papier conduit à une augmentation de la zone de lyse, *i.e.* une augmentation de la bioactivité du papier. Nous avons aussi proposé un indice de bioactivité spécifique des phages sur le papier A_s , qui tient compte de l'influence de la quantité de phages sur l'efficacité des papiers. Pour rendre l'essai encore plus accessible, rapide et facile d'utilisation, un programme informatique dédié à la mesure de la zone de lyse autour du papier bioactif a même été développé par un étudiant stagiaire en informatique, sur la base de nos résultats.

Le grand intérêt d'une telle méthode de test, au niveau de la recherche, est d'associer les phénomènes impliqués dans les trois disciplines des sciences de la vie, des sciences des matériaux, et des sciences de la surface telles que les mécanismes fondamentaux d'interactions entre les phages et les bactéries et la théorie de la zone de lyse, l'influence des propriétés physiques du papier tel que la porosité, et la nature de l'immobilisation des phages sur le papier. La méthode proposée contribue aux retombées bénéfiques concrètes des applications industrielles des papiers bioactifs pour le grand public.

Résistance physique des enzymes et des phages aux contraintes de fabrication

Nous avons calculé de manière fondamentale les ordres de grandeur de la résistance mécanique des agents bioactifs aux contraintes de fabrication des papiers bioactifs.

Nous en avons conclu avec une bonne approximation que si les forces exercées sur un agent bioactif dans une pince d'impression sont grandes, elles ne le sont pas trop pour détériorer les fonctions biologiques des molécules/agents bioactifs.

De manière pratique, nous avons expérimenté la résistance des enzymes et des phages aux contraintes de fabrication des papiers bioactifs.

En ce qui concerne les enzymes, et dans les conditions expérimentales d'impression utilisées, nous avons trouvé qu'une faible porosité de surface des papiers (LWC, couchés légers) permet une meilleure réponse colorimétrique (efficacité) des papiers à base d'enzymes. Nous avons montré que les enzymes ne sont pas affectées négativement par la modification de la viscosité de la bioencre par l'ajout de la carboxyméthylcellulose (CMC), jusqu'à une viscosité optimale de 50 mPa.s; ce qui coïncide avec la viscosité optimale de transfert d'encre sur le papier par impression gravure. Nous avons cependant découvert que la vitesse d'impression a un effet négatif sur la bioactivité des enzymes imprimés sur le papier, alors que la pression d'impression a plutôt un effet global positif sur la bioactivité des enzymes.

En ce qui concerne les phages, nous avons observé que la faible porosité de surface des papiers permet un excellent transfert de la bioencre à base de phages. L'ajout de la carboxyméthylcellulose (CMC) pour modifier la viscosité de la bioencre n'affecte pas négativement l'efficacité des phages. Nous avons découvert que l'augmentation du taux de cisaillement associé à une augmentation de la vitesse d'impression n'affecte pas significativement l'efficacité des phages sur le papier. En revanche, les pressions d'impression élevées réduisent la bioactivité des papiers, malgré une augmentation du taux de transfert de la bioencre à base de phages. Nous avons alors découvert que la bioactivité du papier est négativement affectée par la pénétration accrue des phages dans la porosité du papier. Les phages inclus dans la porosité sont sous la surface du papier et donc inaptes à contacter les bactéries. Nous avons découvert qu'une augmentation du transfert de phages n'est pas équivalente à une meilleure bioactivité finale du papier.

Pour le couchage des phages, nous avons montré que la réduction de la pression de la lame docteur sur le papier, *i.e.* l'augmentation de l'espace entre la lame docteur et le papier, a comme effet significatif d'augmenter l'efficacité des papiers bioactifs. Nous l'expliquons par une déposition des phages davantage à la surface du papier qu'en profondeur, ainsi qu'une pression réduite de la lame de couchage. Nous avons démontré qu'une augmentation de la viscosité n'a pas d'effet significatif sur la bioactivité autrement qu'en fixant le poids de couche, *i.e.* l'augmentation des contraintes de cisaillement résultant d'une plus grande viscosité n'est pas nuisible à l'efficacité des phages. Nous avons conclu que ce n'est pas la totalité des phages déposés sur le papier qui participent à la destruction des bactéries; *i.e.* nous avons observé une plus grande aire spécifique de zone de lyse à des faibles poids de couche. Nos résultats confirment que ce sont les phages de surface et non le transfert total de phages qui est important. Nous avons observé que la CMC peut être utilisée comme modificateur de viscosité de la sauce de couchage, sans que celle-ci n'interfère significativement avec la mobilité et l'efficacité des phages. Nous avons aussi montré que l'utilisation de la gélatine avait un effet positif sur la diffusion des phages et la bioactivité des papiers. Parallèlement, nous avons découvert que des vitesses de couchage élevées, jusqu'à 600 m.min^{-1} , ne compromettent pas de manière appréciable la bioactivité des phages.

Ces travaux et conclusions sont significatifs, car ils répondent à la question fondamentale selon laquelle les agents bioactifs ne résisteraient pas aux contraintes de fabrication à grande échelle des papiers bioactifs. L'impact industriel pratique est que la fabrication à grande échelle de papiers bioactifs à base de phages par des méthodes conventionnelles d'impression et de couchage est une option éminemment viable. Pour leur part, les enzymes sont plus sensibles à une augmentation de la vitesse d'impression alors que les phages sont plus sensibles à une augmentation de la pression d'impression. Pour l'industrie des produits papetiers, l'impact est substantiel, parce que des unités existantes d'impression et de couchage de papiers d'impression-écriture peuvent désormais être utilisées, pratiquement sans modification aucune, pour la fabrication de produits plus rentables et de plus grande valeur ajoutée.

Positionnement des phages en surface du papier

Nous avons démontré que l'immobilisation physique des phages en surface du papier est suffisante pour fabriquer des papiers bioactifs durables. Non seulement le papier n'influence pas négativement les mécanismes d'interaction entre les phages et les bactéries, mais la structure poreuse du papier favorise la diffusion des phages vers les bactéries.

Nous avons aussi vérifié l'hypothèse selon laquelle la distribution des phages sur le papier influe la manière dont les virus s'assemblent. Nous avons aussi montré le bénéfice d'une précouche de polyélectrolyte cationique PolyDADMAC sur la bioactivité des phages appliqués en deuxième couche supérieure, principalement à faible densité de charges cationiques. Cependant, la rugosité du papier rend plus complexe l'optimisation de l'orientation spatiale des phages perpendiculairement à la surface du papier, pouvant même parfois agir à l'encontre de l'effet positif du PolyDADMAC.

Une structure de papier plus fermée, obtenue par raffinage des fibres, maintient les phages à la surface du papier et améliore ainsi la bioactivité, et ce, bien qu'un papier à structure plus « ouverte » (plus perméable), se traduise par un plus grand transfert et une plus grande rétention des phages. Ce qui confirme l'importance de la structure du papier pour à la fois maintenir les phages en surface et les retenir (mécaniquement) dans la porosité de surface du papier et ainsi garantir une plus grande concentration de phages à la surface du papier.

L'impact majeur de ces découvertes au niveau recherche est que les propriétés, principalement de surface du papier, notamment rugosité et porosité, sont des paramètres de contrôle clés lors du développement de papiers d'emballage bioactifs. Au niveau pratique, nous avons donc démontré que, par sa structure poreuse tridimensionnelle, ajustable et modulable, le papier est un matériau extrêmement attrayant pour la fabrication d'emballages bioactifs. De plus, le papier est un matériau « vert », fait à partir de fibres renouvelables dont les coûts de production sont inférieurs à la plupart des autres matériaux.

Conservation des papiers bioactifs

En ce qui concerne les enzymes, nous avons montré une influence significative des conditions de conditionnement sur l'efficacité de la bioencre et sur l'efficacité des papiers bioactifs. Nous avons constaté que la lumière de conditionnement est un paramètre qui influence significativement l'évolution temporelle de la couleur des papiers bioactifs imprimés ainsi que la durée de conservation de la bioencre.

En ce qui concerne les phages, nous avons montré qu'une baisse du taux d'humidité du papier, *i.e.* lors du séchage à température ambiante, réduit la bioactivité des phages. Parallèlement, nous avons découvert que le séchage du papier ne détruit pas les phages, mais que les phages ont besoin d'une humidité minimale pour diffuser à l'extérieur de la porosité de surface et entrer en contact avec les bactéries. Lorsque l'humidité des papiers bioactifs est minimale, les phages sont « inactifs », mais ils retrouvent leur efficacité suite à un remouillage. Nous avons aussi démontré que les phages ne sont pas dénaturés par plusieurs cycles de séchage/réhumidification. La robustesse des phages sur le papier est une découverte majeure : l'humidité du papier est un paramètre additionnel de contrôle à des fins d'optimisation de performance. D'un point de vue de la commercialisation des papiers bioactifs, la conclusion est majeure : cela signifie que le papier bioactif utilisé pour protéger l'aliment bénéficie en retour d'un effet de maintien d'efficacité grâce à l'humidité de l'aliment emballé.

En ce qui concerne l'entreposage à long terme qui occasionne nécessairement un séchage subséquent du papier, nous proposons l'utilisation de la gélatine comme agent de rétention de l'humidité. Nous avons ainsi démontré l'apport significatif de la gélatine sur la durée de conservation des papiers bioactifs. De plus, la gélatine permet aux phages de résister au séchage infrarouge à haute intensité lors du procédé de couchage. Nous avons aussi proposé des raisons fondamentales reliées à la structure et à la composition même de la gélatine pour expliquer son influence positive sur la protection des phages. En présence de gélatine, la conservation de la bioactivité des phages passe de quelques minutes à plusieurs jours.

En résumé, nous avons identifié, confirmé et explicité les effets bénéfiques de l'utilisation de la précouche de PolyDADMAC et de la gélatine et l'importance majeure de la structure de surface du papier sur la rétention et la conservation des agents bioactifs en surface des papiers bioactifs. Pour la fabrication industrielle de papiers d'emballage bioactifs, nous proposons que la gélatine de type A (cationique) utilisée seule peut combiner 1) l'effet cationique du PolyDADMAC sur l'orientation des phages, 2) l'effet de cohésion et de maintien de la couche bioactive, 3) une protection colloïdale des phages et une réduction substantielle de la température de séchage, et 4) une force de gel qui protège mécaniquement les phages contre les contraintes mécaniques de transformation et des conditions d'entreposage des papiers bioactifs à base de phages.

6.2 Travaux futurs

Utilisation d'autres phages ou de cocktails de phages

Pour des raisons de sécurité de nos laboratoires, nos travaux se sont concentrés sur le phage T4 non pathogène dont la forme est cependant similaire aux bactériophages pathogènes. L'étude devra donc être étendue aux autres bactéries pathogènes de contaminations alimentaires, notamment *Listeria*, *Salmonella* et *E.coli* O157:H7.

Selon une proposition⁶⁵ de professeur Mansel Griffiths, Université de Guelph (membre du réseau Sentinel), il serait ainsi nécessaire de poursuivre notre approche avec des cocktails de phages, et ce, pour deux raisons principales. La première est reliée au fait que les bactéries mutent rapidement et que l'utilisation, par exemple de plusieurs souches de phages T4 (ou autres) ciblant la bactérie *E. coli*, maintiendrait l'efficacité bioactive du papier indépendamment des mutations des bactéries. Cela donnerait aussi aux bactériophages plus de latitude à muter eux-mêmes. La seconde raison est reliée à la nécessité de produire des papiers d'emballage bioactifs résistant à plusieurs types de bactéries (cf. *Listeria*, *Salmonella* et *E.coli* O157:H7) de façon à en généraliser les usages et à augmenter le niveau de protection apporté à la société par de tels papiers bioactifs.

⁶⁵ Communication verbale dans le cadre des réunions du réseau Sentinel.

Ces futurs travaux ont par ailleurs été partiellement initiés au cours des travaux de maîtrise de Zeinab Hamzeh [226] et nos propres travaux (hors thèse). La thèse de maîtrise de Zeinab ciblait l'étude de la dynamique de cocktails de phages non pathogènes de type T4. Pour notre part, des phages morphologiquement différents MS2, V20 et V11, respectivement contre les bactéries pathogènes *E. coli*, *Listeria* et *Salmonella* ont été testés en collaboration avec l'Institut de recherche canadien pour la sécurité alimentaire (CRIFS) de l'Université de Guelph qui possède un laboratoire de sécurité de niveau 3 [22]. Tous les résultats ont démontré la robustesse de l'approche et des travaux décrits dans cette thèse, dont l'effet bénéfique protecteur de la gélatine.

Utilisation de la gélatine

Les propriétés de la gélatine comme agent protecteur et milieu environnant favorable pour l'inclusion des phages en surface du papier mériteraient elles aussi quelques études complémentaires. Nos travaux nous ont permis de dégager quelques idées sur les mécanismes fonctionnels de la gélatine. Ils doivent cependant être confirmés alors que d'autres doivent être étudiés. Nous noterons sommairement et non exclusivement, le besoin d'études sur (1) la rapidité de gélification sur papier en fonction de l'épaisseur du film, sur (2) l'optimisation du pouvoir adhésif pour réduire la nécessité de séchage, sur (3) l'effet de la viscosité, sur (4) l'optimisation des propriétés de la gélatine, par exemple par l'ajout d'enzymes (exemple enzyme trans-glutaminase pour obtenir un gel plus visqueux et plus résistant à la température, jusqu'à 100°C [243] en vue d'une amélioration du séchage sur machine), ou encore par la modification chimique du groupement lysine de la gélatine (gonflement amélioré au contact de l'eau [243] en vue de favoriser le relargage de phages avec l'humidité de l'aliment), sur (5) la concentration de la gélatine comme approche pour augmenter/optimiser la force du gel donc aussi la résistance mécanique au stress [243] lors de la fabrication ou de la transformation du papier d'emballage (friction, élasticité, ...).

Endurance de la bioactivité des phages d'un papier bioactif

Il faut noter que, sur la base de nos résultats, des essais pilotes ont été réalisés dans le cadre de la maîtrise UQTR de Gabriel Saint-Pierre-Lemieux [257]).

Lors de ces travaux, la friction occasionnée lors de l'enroulement d'une bobine de papier s'est révélée être un facteur affectant négativement la bioactivité du papier fabriqué.

En fonction de la proposition précédente et des travaux de Gabriel Saint-Pierre-Lemieux, des études sur la résistance des phages, et surtout sur comment l'améliorer, au cours des nécessaires étapes de transformation (*converting*) des papiers nous apparaît aujourd'hui nécessaire. En effet, les phages sur les papiers bioactifs doivent pouvoir résister davantage aux étapes de transformation, du temps de stockage de la bobine mère, du transport, et ce, jusqu'aux dernières étapes de transformation comme la fabrication de petites bobines puis la découpe en feuilles de papier bioactif aux dimensions du client.

Papiers bioactifs et contact alimentaire

Les travaux doivent aussi nécessairement se poursuivre afin de valider l'efficacité des papiers bioactifs en utilisation réelle *in situ*, directement sur de la viande contaminée par les bactéries pathogènes *E. coli* O157:H7, *Salmonella* et *Listeria*. L'effet de différentes matrices alimentaires sur l'efficacité des papiers bioactifs peut aussi faire l'objet de futurs travaux. Ces travaux peuvent aussi être poursuivis en explorant un plus grand nombre de phages pour identifier des phages particulièrement résistants aux conditions de fabrication.

Transfert technologique aux entreprises

Nos recherches devraient aussi se poursuivre sur des unités pilotes semi-industrielles, notamment de traitement de surface par vario-gravure et par couchage à lame, existant par ailleurs au Centre Collégial de Transfert de Technologie Innofibre, partenaire et installé dans la même bâtisse que le CRML de l'UQTR. Il faut ici noter que certains travaux ont d'ores et déjà été initiés dans ce sens (maîtrise UQTR de Gabriel Saint-Pierre-Lemieux). Ceux-ci ont notamment confirmé l'utilité substantielle de la couche de gélatine. D'autres méthodes de couchage, comme le couchage rideau multi-couches pourraient aussi être évaluées.

Incorporation des phages dans la structure du papier

Des procédés autres que le couchage et l'impression pourraient aussi être évalués pour la fabrication de papier bioactifs, comme, par exemple, l'incorporation de phages directement dans la structure fibreuse du papier, lors de l'étape de formation de la feuille sur machine à papier. Certains de nos travaux, étude de faisabilité préliminaire et postérieure à cette thèse, indiquent que les phages d'une taille de l'ordre de 200 nanomètres, en suspension libre, peuvent être physiquement immobilisés, directement dans la structure poreuse du papier. De plus, avec la protection de la gélatine modifiée, nous envisageons que la feuille puisse subir des températures de séchage de 100°C et que les phages survivent. Ces points ont cependant besoin d'être confirmés pour envisager la production de papier bioactif directement sur machine à papier. Notre étude de faisabilité, sous la direction de Prof. Patrice Mangin, montre que les phages peuvent être retenus dans une feuille de papier lors de sa fabrication (avec une pâte raffinée) sur formette dynamique. Ces travaux de suivi exploitent les résultats de nos études de l'impact du raffinage des fibres sur l'immobilisation physique des phages à la surface du papier : un plus haut degré de raffinage des fibres résultant en une structure de papier plus « fermée ».

Des études d'optimisation de l'immobilisation physique de phages dans la structure du papier seraient donc d'un grand intérêt scientifique.

Avenir des papiers d'emballage bioactifs, impacts et mots de la fin

Notre revue bibliographique nous a appris qu'aujourd'hui les divers papiers bioactifs ne dépassent pas le stade du laboratoire. En dehors de nos travaux, les méthodes industrielles de fabrication de papier bioactif ne font pas l'objet d'une attention particulière de la communauté scientifique. Pourtant, les coûts des immobilisations matérielles pour la fabrication industrielle de papiers bioactifs constituent une barrière à l'entrée à la commercialisation et la généralisation de tels papiers.

Par nos travaux, nous avons non seulement démontré la faisabilité de fabrication de papiers d'emballage bioactifs mais nous avons aussi étudié les principaux paramètres nécessaires à leur fabrication. Nous avons proposé plus haut quelques thèmes de recherche et approches nécessaires au développement et à l'approfondissement des connaissances sur les principaux facteurs qui sont nécessaires non seulement à optimiser, mais aussi à diversifier les applications au niveau des papiers d'emballage alimentaires.

En dehors de ces futurs travaux scientifiques, l'emphase doit être mise maintenant sur le transfert technologique afin de généraliser la fabrication de tels papiers d'emballage bioactifs. Les impacts seront doubles, tant (a) au bénéfice de l'industrie des pâtes et papiers qui a un urgent besoin de renouveler son panier de produits suite à la chute des marchés du papier journal et aujourd'hui des papiers impression-écriture (b) au mieux-être de la société par la réduction des contaminations alimentaires grâce à des papiers possédant une nouvelle fonctionnalité d'intérêt : la bioactivité.

En conclusion, nous espérons que nos travaux ont apporté une contribution significative tant à l'industrie dans ses besoins de diversification qu'à la société dans ses besoins de développement: ce qui est, à notre humble avis, un des points majeurs de la recherche scientifique et technologique, et de notre doctorat.

Publications reliées à la thèse

1. Jabrane, T., M. Dubé, M. Griffiths, and P.J. Mangin, *Towards a commercial production of phage-based bioactive paper*. Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes, 2011. **1**(1): p. 6-13.
2. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Manufacturing methods of phage based bioactive paper*. Proceedings of Pulp and Paper Technical Association Canada, 2011. **97**: p. 6-8.
3. Jabrane, T., M. Laloi, M. Dubé, and P.J. Mangin, *Printing and coating of T4 phage based bioactive paper*. Advances in Printing and Media Technology, 2010. **37**: p. 351-358.
4. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Immobilization on Paper Surface: Effect of Cationic Pre-Coat Layer*. Proceedings of Pulp and Paper Technical Association Canada, 2009. **95**: p. 311-315.
5. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Activity on paper surface: Effect of Paper Moisture*. Proceedings of the 8th World Congress of Chemical Engineering. 2009: ISBN 0-920804-44-6.
6. Jabrane, T., J. Jeaidi, M. Dubé, and P.J. Mangin, *Gravure Printing of Enzymes and Phages*. Advances in Printing and Media Technology, 2008. **35**: p. 279-288.

Communications reliées à la thèse

1. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Papermaking of Bioactive Paper*, in *12th Sentinel Network Conference*. 2011: Montréal (QC).
2. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Méthodologies de fabrication de papier bioactif*, in *Dîners Conférences d'Ingénierie*. 2011: Trois-Rivières (QC).
3. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Printing and coating of phage based bioactive paper*, *11th Sentinel Conference*. 2011: Alliston (ON).
4. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Méthodologie de fabrication de papier bioactif*, in *79th congress of ACFAS*. 2011: Sherbrooke (QC).
5. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Manufacturing methods of phage based bioactive paper*, in *97th congress of PAPTAC*. 2011: Montréal (QC).
6. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Emballages bioactifs pour le contrôle de contaminations alimentaires*, in *Concours d'affiches scientifiques*. 2010: Trois-Rivières (QC).
7. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Emballage bioactif pour le contrôle de contaminations alimentaires*, in *PAPTAC 96th congress*. 2010: Montréal (QC).

8. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Les papiers bioactifs et leur fabrication*, in *Les journées du savoir, UQTR*. 2009: Trois-Rivières (QC).
9. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Activity on Paper Surface: Effect of Paper Moisture*, in *8th WCCE World Congress of Chemical Engineering*. 2009: Montréal (QC).
10. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Fabrication de papier bioactif par immobilisation de bactériophages en surface du papier*, in *77th congress of ACFAS*. 2009: Ottawa (ON).
11. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Report from bacteriophage-printing experiments*, in *Sentinel Bacteriophage Workshop. 7th Sentinel Network Conference*. 2009: Fredericton (NB).
12. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Fabrication de papier bioactif par immobilisation de bactériophages en surface du papier*, in *Concours d'affiches scientifiques UQTR*. 2009: Trois-Rivières (QC).
13. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Immobilization on Paper Surface: Effect of Cationic Pre-Coat Layer*, in *95th congress of PAPTAC*. 2009: Montréal (QC).
14. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Immobilization on Paper Surface: Effect of Cationic Pre-Coat Layer*, in *95th PAPTAC student's posters*. 2009: Montréal (QC).
15. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Fabrication de papier bioactif*, in *Colloque L'expérience et le partage du savoir*. 2008: Trois-Rivières (QC).
16. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Coating of bioactive paper: effect of a pre-coat layer on phage activity*, in *6th Sentinel Network Conference*. 2008: Whistler (BC).
17. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Nip printing of phages*, in *5th Sentinel Network Poster Session and conference*. 2008: Hockley Valley (ON).
18. Jabrane, T., R. Voss, M. Dubé, and P. J. Mangin, *Report from bio-printing experiments*, in *Bio-printing Workshop, Sun Chemicals*. 2008: Carlstadt (NJ) (Etats-Unis).
19. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Méthodologies de fabrication de papier bioactif*, in *Concours d'affiches scientifiques UQTR*. 2008: Trois-Rivières (QC)
20. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Fabrication de papier bioactif*, in *Colloque Multidisciplinaire des Cycles Supérieurs*. 2007: Trois-Rivières (QC).
21. Mangin, P.J., T. Jabrane, C. Mercier, and D. Mathou, *Coating and Novel Application Methods*, in *4th Sentinel Network Meeting*. 2007: Edmonton (AB).

Bibliographie

1. Allos, B.M., et al., *Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the FoodNet perspective*. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America, 2004. **38**(3): p. S115-20.
2. Mead, P.S., Laurence Slutsker, Vance Dietz, Linda F. McCaig, Joseph S. Bresee, Craig Shapiro, Patricia M. Griffin, and Robert V. Tauxe, *Food-Related Illness and Death in the United States*. Emerg. Infect. Dis., 1999. **5**(5): p. 607-625.
3. MAPAQ, *Bilan annuel 2010-2011 - Toxi-infections alimentaires*. 2012.
4. DGSAIA, *Bilan annuel 2008-2009 - Toxi-infections alimentaires*. 2010.
5. MAPAQ, *Bilan annuel 2009-2010 - Toxi-infections alimentaires*. 2012.
6. Robert, J.A., *Economic evaluation of Surveillance*. 1996, Dept. of Public health and Policy.
7. Hoffmann, S., M.B. Batz, and J.G. Morris Jr, *Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens*. Journal of Food Protection, 2012. **75**(7): p. 1292-1302.
8. T, K., et al., *Estimating the global burden of foodborne diseases-a collaborative effort*. Euro Surveill., 2009. **14**(18).
9. Dam, A.V. *Superbugs in the Supermarket*. CBC News, 2011.
10. NSERC/CRSNG. *SENTINEL Bioactive Paper Network*. 2011 ; Available from: <http://www.nsercpartnerships.ca/How-Comment/Networks-Reseaux/SENTINEL-SENTINEL-eng.asp>.
11. *Bioactive Paper*. ; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Bioactive_paper.
12. *International Code of Nomenclature of Bacteria*. 1992, Washington (DC): ASM Press.
13. (P.H.A.), S., *Bacterial nomenclature*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria)*, D.R.B.a.R.W. CASTENHOLZ, Editor. 2001, Springer-Verlag: New York. p. 83-88.
14. *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*. ; Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/>.

15. Gracias, K.S. and J.L. McKillip, *A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food*. Canadian Journal of Microbiology, 2004. **50**(11): p. 883-890.
16. D'Aoust, J.-Y., *Salmonella and the international food trade*. International Journal of Food Microbiology, 1994. **24**(1-2): p. 11-31.
17. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index7.html. ; .
18. CDC (2008) *Salmonellosis, May 21, 2008*. In: Department of Health and Human Services (Ed) Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases, Atlanta, Georgia, www.cdc.gov.
19. Allerberger, F., *Listeria*, in *Foodborne Diseases*. 2007. p. 27-39.
20. Agence de la santé publique du Canada (2009) *Écllosion de la bactérie listeria monocytogenes, April 17, 2009 mise à jour définitive*. www.santepublique.gc.ca.
21. Vernozy-Rozand, C. and M.-P. Montet, *Escherichia coli O157:H7 2e édition*. Monographies de microbiologie, ed. Tec&Doc. 2005, Paris: Lavoisier. 145p.
22. Asamoah-Baah, A., *Manuel de sécurité biologique en laboratoire*. 3 ed. Organisation mondiale de la Santé. 2005, Genève.
23. Doyle, M.P. and J.L. Schoeni, *Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis*. Appl. Environ. Microbiol., 1984. **48**(4): p. 855-856.
24. Juneja, V.K., O.P. Snyder, and B.S. Marmer, *Thermal destruction of Escherichia coli O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and Z-values*. International Journal of Food Microbiology, 1997. **35**(3): p. 231-237.
25. Byrne, C.M., et al., *The effect of commercial production and product formulation stresses on the heat resistance of Escherichia coli O157:H7 (NCTC 12900) in beef burgers*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **79**(3): p. 183-192.
26. Davies, A., et al., *Effect of temperature and pH value on the growth of verotoxigenic Escherichia coli*. Leatherhead Food Research Association., Research Report, 1992. **691**.
27. Abdul-Raouf, U.M., L.R. Beuchat, and M.S. Ammar, *Survival and growth of Escherichia coli O157:H7 on salad vegetables*. Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**(7): p. 1999-2006.
28. Miller, L.G. and C.W. Kaspar, *Escherichia coli O157:H7 Acid Tolerance and Survival in Apple Cider*. Journal of Food Protection, 1994. **57**: p. 460-464.

29. Morgan, D., et al., *Verotoxin Producing Escherichia coli O157 Infections Associated with the Consumption of Yoghurt*. Epidemiology and Infection, 1993. **111**(2): p. 181-187.
30. Weagant, S.D., J.L. Bryant, and D.H. Bark, *Survival of Escherichia coli O157:H7 in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Sauces at Room and Refrigerated Temperatures*. Journal of Food Protection, 1994. **57**: p. 629-631.
31. Conner, D., *Temperature and NaCl affects growth and survival of Escherichia coli O157:H7 in poultry-based and laboratory media*. J. Food Sci., 1992. **57**: p. 532-533.
32. Glass, K.A., et al., *Fate of Escherichia coli O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage*. Appl. Environ. Microbiol., 1992. **58**(8): p. 2513-2516.
33. Zhao, T., M.P. Doyle, and R.E. Besser, *Fate of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in apple cider with and without preservatives*. Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**(8): p. 2526-2530.
34. Thomas, A., et al., *Vero Cytotoxin-Producing Escherichia coli, Particularly Serogroup O157, Associated with Human Infections in the United Kingdom: 1989-91*. Epidemiology and Infection, 1993. **110**(3): p. 591-600.
35. Casey, P. and S. Condon, *Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of Escherichia coli O157*. International Journal of Food Microbiology, 2000. **55**(1-3): p. 255-258.
36. Rai, M., M. Chikindas, and C.A.B. International, *Natural antimicrobials in food safety and quality / edited by Mahendra Rai and Michael Chikindas*. 2011: CABI.
37. Banada, P.P. and A.K. Bhunia, *Antibodies and Immunoassays for Detection of Bacterial Pathogens*, in *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, A. Turner, M. Zourob, and S. Elwary, Editors. 2008, Springer.
38. Begley, T.P., W. John, and Sons, *Wiley encyclopedia of chemical biology*. 2009, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. 4 v.
39. Lu, B., M.R. Smyth, and R. O'Kennedy, *Oriented Immobilization of Antibodies and Its Applications in Immunoassays and Immunosensors*. Analyst, 1996. **121**(3): p. 29R-32R.
40. Peluso, P., et al., *Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays*. Analytical Biochemistry, 2003. **312**(2): p. 113-124.

41. Subramanian, A. and W.H. Velander, *Effect of antibody orientation on immunosorbent performance*. Journal of Molecular Recognition, 1996. **9**(5-6): p. 528-535.
42. Spitznagel, T.M. and D.S. Clark, *Surface-Density and Orientation Effects on Immobilized Antibodies and Antibody Fragments*. Nat Biotech, 1993. **11**(7): p. 825-829.
43. B.-K. Hahm, A.K.B., *Effect of environmental stresses on antibody-based detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica serotype Enteritidis and Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 2006. **100**(5): p. 1017-1027.
44. Chauveau, F., C. Pestourie, and B. Tavitian, *Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications*. Pathologie Biologie, 2006. **54**(4): p. 251-258.
45. *Aptamers in Bioanalysis*. 2008: John Wiley & Sons, Inc. 1-30.
46. Fowler, C.C., et al., *Aptamers and Their Potential as Recognition Elements for the Detection of Bacteria*, in *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, A. Turner, M. Zourob, and S. Elwary, Editors. 2008, Springer.
47. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818.
48. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-510.
49. Hermann, T. and D.J. Patel, *Adaptive recognition by nucleic acid aptamers*. Science (New York, N.Y.), 2000. **287**(5454): p. 820-825.
50. Weian Zhao, M.M.A., Michael A. Brook, Yingfu Li., *Rolling Circle Amplification: Applications in Nanotechnology and Biodetection with Functional Nucleic Acids*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(34): p. 6330-6337.
51. Zhao, W., et al., *DNA aptamer folding on gold nanoparticles: From colloid chemistry to biosensors*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(11): p. 3610-3618.
52. D. Leca-Bouvier, B. and L.J. Blum, *Enzyme for Biosensing Applications*, in *Recognition receptors of Biosensors*, M. Zourob, Editor. 2010, Springer. p. 177-220.

53. Bairoch, A., *The ENZYME database in 2000*. Nucl. Acids Res., 2000. **28**(1): p. 304-305.
54. Clark, L.C. and C. Lyons, *ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(1): p. 29-45.
55. Atwood, T., et al., *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2006: Oxford University Press.
56. Di Risio, S. and N. Yan, *Piezoelectric Ink-Jet Printing of Horseradish Peroxidase: Effect of Ink Viscosity Modifiers on Activity*. Macromolecular Rapid Communications, 2007. **28**(18-19): p. 1934-1940.
57. Di Risio, S. and Y. Ning, *Bioactive Paper Through Inkjet Printing*. Journal of Adhesion Science & Technology, 2010. **24**(3): p. 661-684.
58. Savolainen, A., et al., *Printing of polymer microcapsules for enzyme immobilization on paper substrate*. Biomacromolecules, 2011. **12**(6): p. 2008-15.
59. Guerrero, M.P., F. Bertrand, and D. Rochefort, *Activity, stability and inhibition of a bioactive paper prepared by large-scale coating of laccase microcapsules*. Chemical Engineering Science, 2011. **66**(21): p. 5313-5320.
60. Laurienzo, P., et al., *Compatibilized Ny6-based blends as innovative packaging materials: determination of some important properties relevant to food contact application*. Packaging Technology and Science, 2001. **14**(3): p. 109-117.
61. Zhi Fu, G., A. Chan, and D. Minns, *Preliminary Assessment of the Environmental Benefits of Enzyme Bleaching for Pulp and Paper Making (7 pp)*. The International Journal of Life Cycle Assessment, 2005. **10**(2): p. 136-142.
62. Pélach, M.A., et al., *Enzymic deinking of old newspapers with cellulase*. Process Biochemistry, 2003. **38**(7): p. 1063-1067.
63. Carlton, R.M., et al., *Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005. **43**(3): p. 301-312.
64. Bruttin, A. and H. Brussow, *Human volunteers receiving Escherichia coliphage T4 orally: a safety test of phage therapy*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2005. **49**(7): p. 2874-2878.
65. Hagens, S. and M.L. Offerhaus, *Bacteriophages: New Weapons for Food Safety*. Food technology, 2008. **62**(4): p. 46-54.
66. Baker, T.S., N.H. Olson, and S.D. Fuller, *Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from*

- Cryo-Electron Micrographs*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1999. **63**(4): p. 862-922.
67. Rossmann, M.G., *Fitting atomic models into electron-microscopy maps*. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, 2000. **56**(Pt 10): p. 1341-1349.
 68. Rossmann, M.G., et al., *The bacteriophage T4 DNA injection machine*. Current Opinion in Structural Biology, 2004. **14**(2): p. 171-180.
 69. Mosig, G. and F. Eiserling, *T4 and related phages: structure and development*, in *Bacteriophages, The*, R.L. Calendar, Editor. 2005, Oxford University Press USA.
 70. Conley, M.P. and W.B. Wood, *Bacteriophage T4 whiskers: a rudimentary environment-sensing device*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975. **72**(9): p. 3701-3705.
 71. Wood, W.B. and M.P. Conley, *Attachment of tail fibers in bacteriophage T4 assembly: Role of the phage whiskers*. Journal of Molecular Biology, 1979. **127**(1): p. 15-29.
 72. Wood, W.B., Eiserling, F. A, and R.A. Crowther, *Long tail fibers: genes, proteins, structure and assembly*. Molecular Biology of Bacteriophage T4, American Society for Microbiology, ed. J.D. Karam, et al. 1994, Washington D.C.
 73. Abedon, S.T., *Phage Ecology*, in *Bacteriophages, The*, R.L. Calendar, Editor. 2005, Oxford University Press USA.
 74. Goldberg, E., L. Grinius, and L. Letellier, *Recognition, attachment, and injection*. Molecular Biology of Bacteriophage T4, American Society for Microbiology, ed. J.D. Karam, et al. 1994, Washington D.C.
 75. Crowther, R.A., et al., *Molecular reorganization in the hexagon to star transition of the baseplate of bacteriophage T4*. Journal of Molecular Biology, 1977. **116**(3): p. 489-523.
 76. Kanamaru, S., et al., *Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 553-557.
 77. Mosig, G., et al., *Functional relationships and structural determinants of two bacteriophage T4 lysozymes: a soluble (gene e) and a baseplate-associated (gene 5) protein*. New biology, 1989. **1**: p. 171-179.
 78. Adelman, K., E.N. Brody, and M. Buckle, *Stimulation of bacteriophage T4 middle transcription by the T4 proteins MotA and AsiA occurs at two distinct steps in the transcription cycle*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(26): p. 15247-15252.

79. Broker, T.R. and A.H. Doermann, *Molecular and genetic recombination of bacteriophage T4*. Annual Review Of Genetics, 1975. **9**: p. 213-244.
80. Chao, L., *The Meaning of Life*. BioScience, 2000. **50**(3): p. 245-250.
81. Suttle, C.A. and F. Chen, *Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater*. Appl. Environ. Microbiol., 1992. **58**(11): p. 3721-3729.
82. Chopin, A., et al., *Analysis of six prophages in Lactococcus lactis IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations*. Nucl. Acids Res., 2001. **29**(3): p. 644-651.
83. Williams, S.T., A.M. Mortimer, and L. Manchester, *Ecology of soil bacteriophages*, in *Phage Ecology*, S.M. Goyal, C.P. Gerba, and G. Bitton, Editors. 1987, Wiley: NewYork. p. 157-179.
84. Abedon, S.T., T.D. Herschler, and D. Stopar, *Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability*. Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(9): p. 4233-4241.
85. Bull, J.J., D.W. Pfennig, and I.-N. Wang, *Genetic details, optimization and phage life histories*. Trends in Ecology & Evolution, 2004. **19**(2): p. 76-82.
86. Lane, T. and F. Eiserling, *Genetic control of capsid length in bacteriophage T4. VII. A model of length regulation based on DNA size*. Journal of Structural Biology, 1990. **104**(1-3): p. 9-23.
87. Earnshaw, W.C., et al., *The structural organization of DNA packaged within the heads of T4 wild-type, isometric and giant bacteriophages*. Cell, 1978. **14**(3): p. 559-568.
88. Kuo, S.S., et al., *Fast methods for simulation of biomolecule electrostatics*, in *Proceedings of the 2002 IEEE/ACM international conference on Computer-aided design*. 2002, ACM: San Jose, California.
89. Aikio, S., et al., *Bioactive paper and fibre products Patent and literary survey*. 2006, VTT Technical Research Centre of Finland.
90. Pelton, R., *Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(8): p. 925-942.
91. Davis, M.E. and J.A. McCammon, *Electrostatics in biomolecular structure and dynamics*. Chemical Reviews, 1990. **90**(3): p. 509-521.
92. Martin, T.W. and Z.S. Derewenda, *The name is bond--H bond*. Nature Structural Biology, 1999. **6**(5): p. 403-406.

93. Gilson, M.K., et al., *On the calculation of electrostatic interactions in proteins*. Journal of Molecular Biology, 1985. **184**(3): p. 503-516.
94. Sharp, K.A. and B. Honig, *Electrostatic Interactions in Macromolecules: Theory and Applications*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 1990. **19**(1): p. 301-332.
95. Honig, B. and A. Nicholls, *Classical Electrostatics in Biology and Chemistry*. Science, 1995. **268**(5214): p. 1144-1149.
96. Morrison, W.L., *Antimicrobial blended yarns and fabrics comprised of naturally occurring fibers* US Patent 3,959,556. 1976: United States.
97. Morrison, W.L., *Antimicrobially treated fabric construction*. US Patent 4,343,853. 1982: United States.
98. Morrison, W.L., *Antimicrobial non-woven fabric*. US Patent 4,401,712. 1983, Tultex Corporation: United States.
99. Jones, K.L. and C.R. O'melia, *Protein and Humic Acid Adsorption onto Hydrophilic Membrane Surfaces: Effects of pH and Ionic Strength*. Journal of Membrane Science, 2000. **165**(1): p. 31-46.
100. Karra-Chaabouni, M., et al., *Physical Immobilization of Rhizopus Oryzae Lipase onto Cellulose Substrate: Activity and Stability Studies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. **66**(2): p. 168-177.
101. Halder, E., D.K. Chatteraj, and K.P. Das, *Adsorption of Biopolymers at Hydrophilic Cellulose-Water Interface*. Biopolymers 2005. **77**(5): p. 286-295.
102. Lehtio, J., et al., *The Binding Specificity and Affinity Determinants of Family 1 and Family 3 Cellulose Binding Modules*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(2): p. 484-489.
103. Mattinen, M.-L., et al., *Interaction between Cellohexaose and Cellulose Binding Domains from Trichoderma Reesei Cellulases*. FEBS Lett., 1997. **407**(3): p. 291-296.
104. Gerba, C.P. and I.L. Allen, *Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces*, in *Advances in Applied Microbiology*. 1984, Academic Press. p. 133-168.
105. Tolba, M., et al. *Engineering of Bacteriophage Displaying Affinity Tags on Its Head for Biosensor Applications*. in *NSTI-Nanotech 2008*. 2008.
106. Gervais, L., et al., *Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007. **125**(2): p. 615-621.

107. Bennett, A.R., et al., *The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of Salmonella*. Journal of Applied Microbiology, 1997. **83**(2): p. 259-265.
108. Nanduri, V., et al., *Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(6): p. 986-992.
109. Zerda, K.S., et al., *Adsorption of Viruses to Charge-Modified Silica*. Appl. Environ. Microbiol., 1985. **49**(1): p. 91-95.
110. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996, San Diego, California: Academic Press.
111. Su, S., et al., *Adsorption and Covalent Coupling of ATP-Binding DNA Aptamers onto Cellulose*. Langmuir, 2007. **23**(3): p. 1300-1302.
112. Bora, U., et al., *Photoreactive Cellulose Membrane - a Novel Matrix for Covalent Immobilization of Biomolecules*. J. Biotechnol., 2006. **126**(2): p. 220-229.
113. Kong, D.L., et al., *Development of Cellulose-DNA Immunoabsorbent*. Artif. Organs., 2002. **26**(2): p. 200-208.
114. Duracher, D., et al., *Adsorption of Modified HIV-1 Capsid p24 Protein onto Thermosensitive and Cationic Core-Shell Poly(styrene)-Poly(N-isopropylacrylamide) Particles*. Langmuir, 2000. **16**(23): p. 9002-9008.
115. Taniguchi, T., et al., *Adsorption/desorption behavior and covalent grafting of an antibody onto cationic amino-functionalized poly(styrene-N-isopropylacrylamide) core-shell latex particles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **29**(1): p. 53-65.
116. Rossi, S., et al., *Polymer mediated peptide immobilization onto amino-containing N-isopropylacrylamide-styrene core-shell particles*. Colloid & Polymer Science, 2004. **282**(3): p. 215-222.
117. Pichot, C., et al., *Functionalized Thermosensitive Latex Particles: Useful Tools for Diagnostics*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2003. **24**(3-4): p. 423-437.
118. Tyagi, C., L.K. Tomar, and H. Singh, *Surface modification of cellulose filter paper by glycidyl methacrylate grafting for biomolecule immobilization: Influence of grafting parameters and urease immobilization*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **111**(3): p. 1381-1390.
119. Marriott, N.G., *Principles of Food Sanitation*. 5th ed. Food Science Texts Series 2006, Gaithersburg, Md: Aspen Publishers. 75-89.

120. Rees, C., *The use of Phage as Diagnostic Systems*, in *Bacteriophages*, The, R.L. Calendar, Editor. 2005, Oxford University Press USA.
121. Fung, D.Y.C., *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2002. **1**(1): p. 3-22.
122. Malorny, B., et al., *Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **83**(1): p. 39-48.
123. Standardisation, I.O.f., *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, in *ISO 6579:2002*. 2002: Geneva.
124. Standardisation, I.O.f., *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method* in *ISO 11290-1:1996*. 1996: Geneva.
125. Standardisation, I.O.f., *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157* in *ISO 16654:2001*. 2001: Geneva.
126. Lim, D.V., et al., *Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare*. Clin. Microbiol. Rev., 2005. **18**(4): p. 583-607.
127. Stephens, P., *Culture methods*, in *Detecting Pathogens in Food*, T.A. McMeekin, Editor. 2003, Woodhead Publishing.
128. Stephens, P.J., et al., *The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured Salmonella cells*. Journal of Applied Microbiology, 1997. **83**(4): p. 445-455.
129. Daly, P., T. Collier, and S. Doyle, *PCR-ELISA detection of Escherichia coli in milk*. Letters in Applied Microbiology, 2002. **34**(3): p. 222-226.
130. Ramalho de Paula, A.M., et al., *Detection of Salmonella in Foods Using Tecra Salmonella VIA and Tecra Salmonella UNIQUE Rapid Immunoassays and a Cultural Procedure*. Journal of Food Protection, 2002. **65**: p. 552-555.
131. Valdivieso-Garcia, A., et al., *A Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Salmonella Using Biotinylated Monoclonal Antibodies*. Journal of Food Protection, 2001. **64**: p. 1166-1171.
132. Cox, N.A., et al., *Miniaturized kits, immunoassays and DNA hybridization for recognition and identification of foodborne bacteria*. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 1987. **7**: p. 628-631.

133. Hartman, P.A., et al., *Rapid methods and automation, in compendium of methods for the microbiological examination of foods*, C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser, Editors. 1992: Washington, DC. p. 665-746.
134. Hsieh, H.Y. and H.Y. Tsen, *Combination of Immunomagnetic Separation and Polymerase Chain Reaction for the Simultaneous Detection of Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in Food Samples*. Journal of Food Protection, 2001. **64**: p. 1744-1750.
135. Hudson, J.A., et al., *Rapid detection of Listeria monocytogenes in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **90**(4): p. 614-621.
136. Ogden, I.D., N.F. Hepburn, and M. MacRae, *The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of Escherichia coli O157 in foods*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **91**(2): p. 373-379.
137. Chandler, D.P., et al., *Automated immunomagnetic separation and microarray detection of E. coli O157:H7 from poultry carcass rinse*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **70**(1-2): p. 143-154.
138. Jinneman, K.C., et al., *Comparison of Template Preparation Methods from Foods for Amplification of Escherichia coli O157 Shiga-Like Toxins Type I and II DNA by Multiplex Polymerase Chain Reaction*. Journal of Food Protection, 1995. **58**: p. 722-726.
139. Tomoyasu, T., *Improvement of the Immunomagnetic Separation Method Selective for Escherichia coli O157 Strains*. Appl. Environ. Microbiol., 1998. **64**(1): p. 376-382.
140. Marie, D., et al., *Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry*. Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**(1): p. 45-52.
141. de Boer, E. and R.R. Beumer, *Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **50**(1-2): p. 119-130.
142. Van der Zee, H. and J.H.J. Huis in't Veld, *Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis*. Journal of AOAC International, 1997. **80**: p. 934-940.
143. Griffiths, M.W., *Rapid microbiological methods with Hazard*. Journal of AOAC International, 1997. **80**: p. 1143-1150.
144. Holah, J.T., R.P. Betts, and R.H. Thorpe, *The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces*. Journal of Applied Bacteriology, 1988. **65**: p. 215-221.

145. Boisen, F., et al., *Quantitation of microorganisms in raw minced meat using the direct epifluorescence filter technique: NMKL collaborative study*. Journal of AOAC International, 1992. **75**: p. 465-473.
146. Feng, P., *Development and impact of rapid methods for detection of food-borne pathogens in Food microbiology: fundamentals and frontiers*, M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville, Editors. 2001, ASM Press: Washington, DC.
147. Chappelle, E.W. and G.V. Levin, *Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria*. Biochemical Medicine, 1968. **2**(1): p. 41-52.
148. Sanders, M.F., *A rapid bioluminescent technique for the detection and identification of Listeria monocytogenes in the presence of Listeria innocua*, in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*, A.K. Campbell, L.J. Kricka, and P.E. Stanley, Editors. 1995, Wiley: Chichester. p. 454-457.
149. Stewart, G.S.A.B., M.J. Loessner, and S. Scherer, *The bacterial lux gene bioluminescent biosensor revisited*. ASM News, 1996. **62**: p. 297-301.
150. Griffiths, M. and L. Brovko, *ATP bioluminescence*, in *Detecting Pathogens in Food*, T.A. McMeekin, Editor. 2003, Woodhead Publishing.
151. Richard J Mole, T.W O.C.M., *Phage as a diagnostic - the use of phage in TB diagnosis*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2001. **76**(7): p. 683-688.
152. Rees, C.E.D., et al., *Methods for rapid microbial detection*. PCT PatentWO 92/02633. 1996: United States.
153. Stewart, G.S., et al., *The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification*. Journal of Applied Microbiology, 1998. **84**(5): p. 777-783.
154. Loessner, M., M. Rudolf, and S. Scherer, *Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of Listeria monocytogenes in contaminated foods*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(8): p. 2961-2965.
155. Turpin, P.E., et al., *A rapid luminescent-phage based MPN method for the enumeration of Salmonella typhimurium in environmental samples*. Letters in Applied Microbiology, 1993. **16**(1): p. 24-27.
156. Chen, J. and M.W. Griffiths, *Salmonella Detection in Eggs Using Lux+ Bacteriophages*. Journal of Food Protection, 1996. **59**: p. 908-914.
157. Ulitzur, S. and J. Kuhn, *Introduction of lux genes into bacteria: a new approach for specific determination of bacteria and the antibiotic susceptibility*, in

Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives, R. Slomerich, et al., Editors. 1987, Wiley: New York.

158. Kodikara, C.P., H.H. Crew, and G.S.A.B. Stewart, *Near on-line detection of enteric bacteria using lux recombinant bacteriophage*. FEMS Microbiology Letters, 1991. **83**(3): p. 261-265.
159. Loessner, M., et al., *Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable Listeria cells*. Appl. Environ. Microbiol., 1996. **62**(4): p. 1133-1140.
160. Pearson, R.E., et al., *Construction of D29 shuttle phasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria*. Gene, 1996. **183**(1-2): p. 129-136.
161. Sarkis, G.J., W.R. Jacobs, Jr., and G.F. Hatfull, *L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria*. Molecular Microbiology, 1995. **15**(6): p. 1055-1067.
162. Sanders, M., Frederick, *Methods and kits for detection of bacteria*. Patent WO/1994/006931. 1994.
163. Stanley, P.E., *Commercially available fluorometers, luminometers and imaging devices for low-light level measurements and allied kits and reagents: survey update 6*. Luminescence, 1999. **14**(4): p. 201-213.
164. Stanley, P.E., *Commercially available luminometers and low-level light imaging devices*, in *Methods in Enzymology*. 2000, Academic Press. p. 96-103.
165. Riska, P.F., et al., *Rapid Film-Based Determination of Antibiotic Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis Strains by Using a Luciferase Reporter Phage and the Bronx Box*. J. Clin. Microbiol., 1999. **37**(4): p. 1144-1149.
166. Jacobs, W.R., Jr., et al., *Rapid Assessment of Drug Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis by Means of Luciferase Reporter Phages*. Science, 1993. **260**(5109): p. 819-822.
167. Wolber, P.K., *Bacterial ice nucleation*. Advances in Microbial Physiology, 1993. **34**: p. 203-237.
168. Kuhn, J., et al., *Detection of bacteria using foreign DNA: the development of a bacteriophage reagent for Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **74**(3): p. 229-238.
169. Cutter, C.N., *Microbial control by packaging: a review*. Critical reviews in food science and nutrition, 2002. **42**(2): p. 151-161.

170. Lopez-Rubio, A., R. Gavara, and J.M. Lagaron, *Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(10): p. 567-575.
171. Krupnick, S., *Antimicrobial treatment of currency paper*. PCT PatentWO 99/42658. 1999: United States.
172. Klimpl, F. and K. Sonenberg, *Antimicrobial Paper*. US Patent 6,939,442 B2. 2005: United States.
173. <http://www2.kleenex.com/fr/antiviral/>. ; .
174. Intili, H.S., *Antimicrobial Paper*. US Patent 4,533,435. 1985: United States.
175. Andres W. Martinez, Scott T.P., Manish J. Butte, George M. Whitesides,, *Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays*13. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(8): p. 1318-1320.
176. Chapman, P.A. and R. Ashton, *An evaluation of rapid methods for detecting Escherichia coli O157 on beef carcasses*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **87**(3): p. 279-285.
177. Conard Holton, W., *E. coli Exposed*. Environmental Health Perspectives, 2002. **110**(10): p. 586-589.
178. Sobsey, M.D. and F.K. Pfaender, *Evaluation of the H₂S method for the detection of fecal contamination of drinking-water*, in *Water Sanitation and Health, Drinking Water Quality*. 2002, World Health Organization: Geneva.
179. Mulczyk, M. and A. Szewczuk, *Pyrrolidonyl peptidase in bacteria: a new colorimetric test for differentiation of enterobacteriaceae*. Journal of general microbiology, 1970. **61**: p. 9-13.
180. Kane, R.S., et al., *Patterning proteins and cells using soft lithography*. Biomaterials, 1999. **20**(23-24): p. 2363-2376.
181. Bernard, A., et al., *Printing Patterns of Proteins*. Langmuir, 1998. **14**(9): p. 2225-2229.
182. Blawas, A.S. and W.M. Reichert, *Protein patterning*. Biomaterials, 1998. **19**(7-9): p. 595-609.
183. Morozov, V.N. and T.Y. Morozova, *Electrospray Deposition as a Method for Mass Fabrication of Mono- and Multicomponent Microarrays of Biological and Biologically Active Substances*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(15): p. 3110-3117.

184. Barron, J.A., et al., *Biological Laser Printing: A Novel Technique for Creating Heterogeneous 3-dimensional Cell Patterns*. Biomedical Microdevices, 2004. **6**(2): p. 139-147.
185. Jörg Burgold, F.W., Michael Fischer, Gregor Schlingloff, Thomas Henkel, Jens Albert, Günther Mayer, Andreas Schober., *Evolution and Operating Experiences with Different Drop-On-Demand Systems*. Macromolecular Rapid Communications, 2005. **26**(4): p. 265-280.
186. Schober, A., et al., *Microsystems for independent parallel chemical and biological processing*. Microsystem Technologies, 1995. **1**(4): p. 168-172.
187. Kraus, T., et al., *Nanoparticle printing with single-particle resolution*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(9): p. 570-576.
188. Mossoba, M.M., et al., *Printing microarrays of bacteria for identification by infrared microspectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2005. **38**(1-2): p. 229-235.
189. Kipphan, H., *Handbook of print media :technologies and production methods*, ed. H. Kipphan. 2001, New York: Springer-Verlag.
190. Cohen, E.D. and E.B. Gutoff, *Modern Coating and Drying Technology*, ed. VCH. 1992, New York.
191. Kistler, S.F. and P.M. Schweizer, *Liquid Film Coating: Scientific Principles and Their Technological Implications*, ed. C. Hall. 1997, London.
192. Schweizer, P.M., *Simultaneous Multilayer Coating Technologies: Attractiveness and Limitations*, in *TAPPI Coating Conference*. 2002: Orlando, FL, USA. p. 1-14.
193. Alleborn, N., *Progress in coating theory*. Thermal Science, 2001. **5**(1): p. 131-152.
194. Decher, G. and J.B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, ed. Wiley-VCH. 2002, Weinheim.
195. Yoo, P.J., et al., *Spontaneous Assembly of Viruses on Multilayer Polymer Surfaces*. Nature Materials, 2006. **5**(3): p. 234-240.
196. Xing, Q., S.R. Eadula, and Y.M. Lvov, *Cellulose Fiber-Enzyme Composites Fabricated through Layer-by-Layer Nanoassembly*. Biomacromolecules, 2007. **8**(6): p. 1987-1991.
197. Westman, E., M. Ek, and L. Wagberg, *Antimicrobial Activity of Polyelectrolyte Multilayer-Treated Cellulose Films*. Holzforschung, 2009. **63**: p. 33-39.

198. Jabrane, T., *Curtain Coating of Bioactive Paper - MSPPS Specialized Master in Pulp and Paper Science*, in *Final Project Report*. 2007, INP Grenoble EFPG : Grenoble. p. 49.
199. Roux, P.J.-C., *Master Specialized in Pulp and Paper Science*, in *Course PPPF-02*. 2006/2007: INP Grenoble - EFPG.
200. CanPa, *A versatile system for papermaking in the laboratory*. 2007.
201. Jabrane, T., et al., *Printing and coating of T4 phage based bioactive paper*. *Advances in Printing and Media Technology*, 2010. **37**: p. 351-358.
202. Seok-In Hong, *Gravure-printed colour indicators for monitoring Kimchi fermentation as a novel intelligent packaging*. *Packaging Technology and Science*, 2002. **15**(3): p. 155-160.
203. Linnonmaa, J. and M. Trefz, *Pigment coating techniques*, in *Pigment Coating and Surface Sizing of Paper*, E. Lehtinen, Editor. 2000, Fapet Oy: Jyväskylä, Finland. p. 415-488.
204. Belgacem, N., *Lecture "Coating of paper - Surface treatments"*, in *Master Specialized in Pulp And Paper Science*. 2007, Ecole Francaise de Papeterie et des Industries Graphiques: Grenoble, France.
205. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Manufacturing methods of phage based bioactive paper*, in *97th congress of PAPTAC*. 2011: Montréal (QC).
206. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Immobilization on Paper Surface: Effect of Cationic Pre-Coat Layer*, in *PAPTAC 95th Annual Meeting*, PAPTAC, Editor. 2009: Montréal. p. 311-315.
207. Jabrane, T., M. Dubé, and P.J. Mangin, *Bacteriophage Activity on paper surface: Effect of Paper Moisture*, in *Proceedings of the 8th World Congress of Chemical Engineering ISBN 0-920804-44-6*. 2009: Montréal.
208. Jabrane, T., et al., *Towards a commercial production of phage-based bioactive paper*. *Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes*, 2011. **1**(1): p. 6-13.
209. Wommack, K.E. and R.R. Colwell, *Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000. **64**(1): p. 69-114.
210. Williamson, K.E., M. Radosevich, and K.E. Wommack, *Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005. **71**(6): p. 3119-3125.
211. Danovaro, R., et al., *Determination of Virus Abundance in Marine Sediments*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001. **67**(3): p. 1384-1387.

212. Wommack, K.E., et al., *Methods for the Isolation of Viruses from Environmental Samples*, in *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 2008. p. 3-14.
213. Fortier, L.-C. and S. Moineau, *Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes*, in *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 2008. p. 203-219.
214. Ackermann, H.-W., *Basic Phage Electron Microscopy*, in *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 2008. p. 113-126.
215. Kropinski, A.M., et al., *Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay*, in *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 2008. p. 69-76.
216. Wagberg, L. and L. Odberg, *Polymer Adsorption on Cellulosic Fibers*. Nordic Pulp & Paper Research Journal, 1989. **4**(2): p. 135-140.
217. TAPPI, *Equilibrium relative humidities over saturated salt solutions*, in *TIP 0808-03*. 2002.
218. Lee, T.-M., et al., *The effect of shear force on ink transfer in gravure offset printing*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2010. **20**(12): p. 125026.
219. FDA, *FDA approval of Listeria-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products*. 2006. **Washington, DC**.
220. Zourob, M. and S. Ripp, *Bacteriophage-Based Biosensors*, in *Recognition receptors in Biosensors*, M. Zourob, Editor. 2010, Springer. p. 415-448.
221. Amanda Mazzocco, T.E.W., Erika Lingohr, and Roger P. Johnson, *Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay*. Humana Press ed. Methods in Molecular Biology, ed. J.M. Walker. Vol. Bacteriophages, Methods and Protocols. 2009.
222. Kajanto, I., J. Laamanen, and M. LKainulainen, *Paper bulk and surface*, in *Paper Physics*, F.P.a.P.R.I. Niskanen Kaarlo, Editor. 1998, Fapet Oy: Helsinki. p. 89-115.
223. Hosseinidoust, Z., T.G.M. Van de Ven, and N. Tufenkji, *Bacterial capture efficiency and antimicrobial activity of phage-functionalized model surfaces*. Langmuir, 2011. **27**(9): p. 5472-80.
224. Archer, M. and J. Liu, *Bacteriophage T4 Nanoparticles as Materials in Sensor Applications: Variables That Influence Their Organization and Assembly on Surfaces*. Sensors, 2009. **9**(8): p. 6298-6311.
225. Abedon, S.T. and J. Yin, *Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis*, in *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 2008. p. 161-174.

226. Hamzeh, Z., *Étude sur l'utilisation de cocktail de bactériophages pour l'élaboration de surfaces antibactériennes*. 2014, Université du Québec à Trois-Rivières.
227. Hongo, M. and A. Murata., *Bacteriophages of Clostridium saccharoperbutylacetonicum. II. Enumeration of phages by application of the plaque-count technique and some factors influencing the plaque formation*. Agricultural and Biological Chemistry, 1965. **29**: p. 1140–1145.
228. Adams, M.D., *Bacteriophages*, Interscience, New York. 1959.
229. Lee, Y. and J. Yin, *Imaging the propagation of viruses*. Biotechnol Bioeng, 1996. **52**(3): p. 438-42.
230. Lee, Y. and J. Yin, *Detection of evolving viruses*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(4): p. 491-3.
231. Hogg, S., *Microbial Nutrition and Cultivation*, in *Essential Microbiology*. 2005, Wiley. p. 79-90.
232. Daniel, F., *Rapid Methods for Detecting Microbial Contaminants in Foods*, in *Microbial Food Contamination, Second Edition*. 2007, CRC Press.
233. Pattee, P.A., *Use of tetrazolium for improved resolution of bacteriophage plaques*. Journal of Bacteriology, 1966. **92**: p. 787-788.
234. Agha, A.Q. and J. Douglas, *Enhancement of Plaque Size of a Staphylococcal Phage*. Journal of Applied Microbiology, 1976. **40**(1): p. 109-110.
235. McConnell, M. and A. Wright, *An anaerobic technique for increasing bacteriophage plaque size*. Virology, 1975. **65**(2): p. 588-590.
236. Coyle, D.J., C.W. Macosko, and L.E. Scriven, *Film-splitting flows in forward roll coating*. Journal of Fluid Mechanics Digital Archive, 1986. **171**(-1): p. 183-207.
237. Simson, D.A., et al., *Statistical Breakage of Single Protein A-IgG Bonds Reveals Crossover from Spontaneous to Force-Induced Bond Dissociation*. Physical Review Letters, 1999. **83**(3): p. 652.
238. Gennes, P.-G.d., *Scaling concepts in polymer physics*. 1979, Ithaca, N.Y.: Cornell University Press. 324.
239. De Grâce J. H., M., P. J., *A mechanistic approach to ink transfer. Part I: Effect of substrate properties and press conditions*. Advances in Printing Science and Technology, W.H. Banks Ed., Pentech Press (London), 1984. **17**.

240. Anany, H., et al., *Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(18): p. 6379-87.
241. Krone, S.M. and S.T. Abedon, *Modeling phage plaque growth*. Bacteriophage Ecology, Cambridge University Press, 2008: p. 415-438.
242. Schrieber, R. and D.H. Gareis, *Practical Aspects*, in *Gelatine Handbook - Theory and Industrial Practice*, Wiley-VCH, Editor. 2007. p. 119-299.
243. Schrieber, R. and D.H. Gareis, *From Collagen to Gelatin*, in *Gelatine Handbook - Theory and Industrial Practice*, Wiley-VCH, Editor. 2007. p. 45-118.
244. Kozuka, H., *Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications*, in *Series in Engineering & Computer Science*. 2005. p. 1980.
245. Peter Koepff, H., et al., *Process For making Gelatine Films*. 1994. p. 6.
246. Weise, E. *Engineer: DuPont hid facts about paper coating*. USA Today 2005 ; Available from: http://usatoday30.usatoday.com/money/companies/management/2005-11-16-dupont-usat_x.htm.
247. Action, O.C. *ConAgra seeking substitutes for fluorocarbons in food packaging - Effort seeks to avoid traces of PFOA, the "Teflon Chemical"*. 2013 ; Available from: http://www.ohiocitizen.org/campaigns/dupont_c8/c_agrasub.htm.
248. Shankar, A., J. Xiao, and A. Ducatman, *Perfluorooctanoic acid and cardiovascular disease in us adults*. Archives of Internal Medicine, 2012. **172**(18): p. 1397-1403.
249. Renner, R., *It's in the microwave popcorn, not the Teflon pan*. Environmental Science & Technology, 2006. **40**(1): p. 4-4.
250. Guimard, N.K., N. Gomez, and C.E. Schmidt, *Conducting polymers in biomedical engineering*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8-9): p. 876-921.
251. Koetz, J. and S. Kosmella, *Nanoparticles and Polyelectrolytes*, in *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. 2007, Springer Berlin Heidelberg. p. 47-71.
252. *Detecting pathogens in food / edited by Thomas A. McMeekin*. Woodhead Publishing in food science and technology, ed. T.A. McMeekin. 2003, Cambridge, England : Boca Raton, FL :: Woodhead; CRC Press.
253. Klemm, D., et al., *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(22): p. 3358-93.

254. Serwer, P. and M.E. Pichler, *Electrophoresis of bacteriophage T7 and T7 capsids in agarose gels*. J. Virol., 1978. **28**(3): p. 917-928.
255. Cummings, D.J., et al., *Characterization of T-Even Bacteriophage Substructures I. Tail Fibers and Tail Tubes*. Journal of Virology, 1970. **6**(4).
256. Showe, M.K. and L. Onorato, *Kinetic factors and form determination of the head of bacteriophage T4*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(9): p. 4165-4169.
257. St-Pierre-Lemieux, G., *Papiers bioactifs à base de phages pour emballage alimentaire - études en vue d'une production pilote*. 2014, Université du Québec à Trois-Rivières.
258. CanPa. *Dynamic Sheet Former (Formette Dynamique)* 2007 ; Available from: <http://www.youtube.com/watch?v=C5LvTLoRs6Q>.
259. Gratia, J.-P., *André Gratia: A Forerunner in Microbial and Viral Genetics*. Genetics, 2000. **156**(2): p. 471-476.
260. Hogg, S., *Microbial Growth*, in *Essential Microbiology*. 2005, Wiley. p. 91-107.

Annexe 1 : Protocole de fabrication de papiers par formette dynamique

Les paramètres expérimentaux de la formette dynamique STOCK, PUMP, WIRE, DWT sont définis ci-après :

STOCK : Paramètre qui permet de régler le volume de pâte utilisée lors de la formation de la feuille. Les chiffres de 0 à 10 donnent une indication sur la quantité de pâte déposée. Note : Pour un contrôle précis de la reproductibilité du grammage de la feuille, une quantité exacte de pâte est utilisée pour former une seule feuille à la fois.

PUMP : Paramètre qui permet de contrôler le débit de pâte sortant de la buse. Le débit de pâte peut varier entre 0.3 et 4.4 L.min⁻¹ [200]. Une échelle allant de 1 à 99 donne une indication de la vitesse de jet, 1 étant la vitesse la plus basse. Ce paramètre influence l'anisotropie (orientation) des fibres dans la feuille de papier.

WIRE : Paramètre qui permet de changer la vitesse de rotation de la toile. La vitesse de rotation de la toile varie entre 700 et 1900 m.min⁻¹ [200]. Une échelle de 1 à 99 donne une indication de la vitesse de la toile, 1 étant la vitesse la plus basse.

DWT : Paramètre qui permet de contrôler le temps de drainage de la feuille. Une échelle de 1 à 99 donne une indication du temps de drainage, 99 étant le temps le plus long.

Après avoir défini ces 4 paramètres, la quantité de pâte nécessaire pour former une feuille d'un certain grammage est versée dans le réservoir de pâte. La pâte est diluée avec de l'eau à température ambiante afin de ne pas dépasser la consistance maximale de pâte de 1% jusqu'à 2%, pour ne pas bloquer l'embouchure de la buse utilisée.

Le démarrage de la pompe de circulation de la pâte permet une certaine défloculation de la suspension fibreuse, afin de reproduire l'effet de la caisse de tête. La pale se trouvant dans le réservoir est activée pour mélanger davantage la pâte. La toile de formation est disposée dans le cylindre rotatif de formation de la feuille en s'assurant de mettre le côté accueillant la suspension fibreuse vers l'intérieur. La toile est alors généreusement mouillée pour la coller au cylindre de formation.

L'angle de la buse de jet de pâte par rapport à la surface de la toile de formation peut être ajusté pour modifier l'anisotropie (orientation des fibres) de la feuille de papier.

La formation de la feuille commence lors de la mise en rotation du cylindre à la vitesse WIRE. Un film d'eau est formé sur la toile, ce qui se traduit par une couleur de la toile nettement plus foncée. La buse de jet de pâte effectue des mouvements de va-et-vient, de bas en haut, tout en envoyant de la pâte sous forme de jet jusqu'à ce que le volume de pâte voulu soit atteint.

Le drainage de la feuille consiste à évacuer l'eau à travers la feuille pour reproduire le drainage sur une machine à papier. À la fin du drainage, la feuille est formée. La siccité de la feuille est alors d'environ 20% [200]. La toile est ensuite retirée de la toile en l'enroulant soigneusement sur elle-même pour éviter d'abîmer la feuille.

Le pressage de la feuille est préparé par la mise à plat du côté papier sur un feutre. Il faut ensuite retirer délicatement la toile de la feuille. Un revêtement en téflon est mis à l'emplacement précédent de la toile. L'extrémité de l'empilement feutre/feuille/téflon est placée sous la presse avec le téflon vers le haut (Figure A-6-1, à gauche). La feuille est pressée typiquement à trois pressions 3, 5 et 6 bars pour reproduire le pressage d'une machine à papier. À la sortie de la presse, la feuille est séchée avec un séchoir de laboratoire (Figure A-6-1, à droite) à 55°C pendant 10 à 15 minutes.

Une vidéo du fonctionnement de la formette dynamique CanPa® utilisée est par ailleurs disponible [258].



Figure A-6-1 Presse et séchoir de laboratoire

Annexe 2 : Méthode d'énumération des lysats de phages

Les matériels et équipements utilisés pour la préparation de milieux de culture solides et en bouillon sont : des boîtes de Petri de 90 mm, des tubes en verre 13x100 mm avec bouchons en plastique⁶⁶, des micropipettes⁶⁷ pour des volumes variables de 1 mL, 100 µl et 10 µl avec les embouts de pipettes stériles correspondants, des tubes de dilution stériles (soit tubes 1,5 mL de micro-centrifugation refermables, tubes 13x100 mm refermables, tubes de titrations stériles Titertubes® de Biorad en rack de 8x12 tubes), des enduiseurs stériles de boîtes de Petri, un dispositif de prédosage de milieu de culture tiède en volumes de 3 mL et une plaque chauffante ou bain-marie pour maintenir les tubes 13x100mm à 48°C.

Les milieux de culture sont généralement préparés à partir d'une formulation incluant préalablement de l'agar. Dans une approche double-couche, nous utilisons une formulation de bouillon à laquelle est ajoutée une quantité d'agar différente, en fonction de la préparation de la couche inférieure d'agar ou de la couche supérieure d'agar.

La formulation de bouillon de soya tryptique (Difco Lab., Becton Dickinson & co) est composée de digestion pancréatique de caséine (17,0 g.L⁻¹), digestion papaique de germes de soya (3,0 g.L⁻¹), chlorure de sodium (5,0 g.L⁻¹), phosphate dipotassique (2,5 g.L⁻¹) et de dextrose (2,5 g.L⁻¹).

Les phages nécessitent des séries de dilutions pour être énumérés. Les phages sont dilués dans un diluant saline-magnésium (SM) ou un diluant lambda (λ). Le diluant lambda utilisé est composé de MgSO₄. 7H₂O (2,0 g.L⁻¹) et de Tris-HCl 1M (pH 7,5) (10 mL.L⁻¹). Le diluant est apprêté en volumes de 10 mL suffisants pour une série de dilutions de phages, dans des tubes à bouchon vissé, avant d'être stérilisé à la chaleur et stocké à 4°C jusqu'à 3 mois de conservation.

⁶⁶ Les bouchons peuvent être auto-clavables et réutilisables plusieurs fois.

⁶⁷ Les micropipettes doivent être stérilisées au moins toutes les semaines et recalibrées périodiquement.

Le milieu de culture agar de la couche inférieure est préparé selon les instructions du fabricant, en ajoutant de l'agar pour obtenir une concentration finale d'agar de 15 g.L^{-1} , avant de stériliser le milieu à la chaleur.

Lorsque le milieu de culture est refroidi à $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$, une quantité de CaCl_2 1M est ajoutée pour obtenir la concentration finale désirée de $1\text{-}10 \text{ mmol}$ ou $1\text{-}10 \text{ mL.L}^{-1}$, avant de maintenir le milieu à $48\text{-}50^{\circ}\text{C}$. Un volume de 18 à 25 mL de milieu de culture est ensuite versé dans chaque boîte de Petri, avant d'ensacher et stocker les boîtes de Petri à 4°C jusqu'à 2 mois de temps de conservation.

Le milieu de culture agar de la couche supérieure est préparé selon les instructions du fabricant, en ajoutant de l'agar pour obtenir une concentration finale de $4\text{-}6 \text{ g.L}^{-1}$. Lorsque les phages développent de petites plages de lyses, les plages de lyses sont plus visibles à la plus petite concentration d'agar. Le milieu de culture est ensuite chauffé pour faire fondre l'agar, avant d'ajouter une quantité de CaCl_2 1M au mélange bouillon/agar pour obtenir la concentration désirée de $1\text{-}10 \text{ mM}$ ou $1\text{-}10 \text{ mL.L}^{-1}$. Le milieu de culture préparé doit être rapidement versé par volumes de 3 mL dans des tubes stériles de $10 \times 100 \text{ mm}$ en verre, avant de mettre un bouchon, stériliser à la chaleur, et stocker à 4°C jusqu'à 1 mois de conservation. Pour un stockage jusqu'à 3 mois, verser des aliquotes de $50\text{-}100 \text{ mL}$ du milieu de culture dans des bouteilles à bouchon qui se visse, appliquer le bouchon sans serrer, stériliser à la chaleur, serrer les bouchons et stocker à 4°C . L'utilisation du milieu de culture consiste à chauffer les tubes contenant le milieu de culture supérieur, afin de faire fondre l'agar, avant de le maintenir à $46\text{-}48^{\circ}\text{C}$ dans un bain-marie ou sur une plaque chauffante. Il est très important de noter que la préparation d'agar soit amenée à complète ébullition, autrement les parties cristallines qui peuvent rester rendront les boîtes de Petri très difficiles à interpréter.

La méthode d'énumération des phages peut être réalisée par la méthode en simple couche d'agar, décrite par d'Hérelle en 1917 ou par la méthode en double couche d'agar décrite par André Gratia [259].

La méthode en simple couche d'agar (Annexe 5) est plus simple et plus rapide, mais la méthode utilisée est celle en double couche d'agar, formalisée par Mark Adams en 1959 [228]. Cette dernière est généralement considérée comme la plus précise, favorisant les plages de lyse plus larges et avec une morphologie bien définie.

La méthode d'énumération des lysats de phages en double couche d'agar s'applique à un lysat de phage contenant 10^6 à 10^{11} upf.mL⁻¹. La quantité de boîte de Petri à prévoir dépend de l'intervalle de dilutions et du nombre de répliquas pour chaque dilution. Les étapes suivantes décrivent la méthode d'énumération des phages :

1. Retirer le nombre nécessaire de boîtes de Petri de couche inférieure d'agar du stockage à 4°C (besoin de 7 boîtes de Petri : 6 boîtes pour les dilutions de phage et 1 boîte pour le contrôle bactérien sans phages). Faire sécher les boîtes de Petri inclinées et à l'envers dans un incubateur à 37°C pendant 1-2 heures ou partiellement découvertes sous une hotte à débit laminaire pendant 10-15 min.

Note : L'état du milieu de culture « inférieur » est important, car il ne doit être ni trop sec ni trop humide ; les deux facteurs affectant négativement le développement des plages de lyse.

2. Lorsque les boîtes de Petri sont sèches, les rassembler et les numérotter séquentiellement avec les dilutions de mise en place (exemple : « -4 » à « -9 ») et identifier la boîte de Petri « contrôle ».

3. Retirer le nombre nécessaire de tubes contenant 3 mL du milieu de culture « supérieur » du stockage à 4°C, chauffer les tubes pour faire fondre l'agar du milieu de culture, et placer les tubes dans un bain-marie ou une plaque chauffante réglée à 48°C.

Note : Le milieu de culture doit être complètement fondu et sans grumeaux.

4. Monter une rangée de 9 tubes stériles bouchonnés ou de tubes de micro-centrifugation. Numérotter les avec les dilutions 10x séquentielles appropriées (ex. « -1 » à « -9 ») et ajouter 900 µL de diluant dans chaque tube, en milieu stérile.

Note : Puisque la plupart des lysats de phages contiennent entre 10^6 et 10^{11} ufp.mL⁻¹, des dilutions de 10^{-5} à 10^{-9} conduiront à un nombre comptable de plages de lyse sur boîte de Petri. Si le lysat de phages est purifié, la concentration peut dépasser 10^{13} ufp.mL⁻¹ et les dilutions doivent être poursuivies au-delà de 10^{-9} .

5. Ajouter 100 µl de lysat de phages au premier tube, mélanger, changer d'embout de pipette et transférer 100 µl au second tube de la série.

Note : Un mélange suffisant est atteint par centrifugation « douce » en tapotant le tube avec un doigt, puis en retournant à l'envers le tube de micro-centrifugation fermé. Le mélange vigoureux d'une suspension de phages n'est pas recommandé.

6. En utilisant un embout de pipette neuf à chaque transfert, poursuivre les dilutions 10 fois. Au dernier tube, la préparation de phages aura été diluée $1/10^9$ ou 10^{-9} .

Note : Les dilutions peuvent être stockées à 4°C jusqu'à ce que l'énumération soit terminée et qu'un nombre précis de phages soit obtenu.

7. En travaillant rapidement, avec un tube à la fois, transférer 100 µl de la dilution de phages sélectionnée dans un tube tiède de milieu de culture « supérieur », ajouter immédiatement 2 gouttes (~100 µl) d'une culture bactérienne hôte datant de préférence de la veille, mélanger comme plus haut, et verser le contenu à la surface d'une boîte de Petri sèche et étiquetée.

Note : Le volume de la culture bactérienne nécessaire pour obtenir un tapis aggloméré avec des plages clairement visibles varie typiquement entre 50 et 200 µl.

Note : Le mélange permet d'obtenir une distribution homogène des phages et des bactéries sur le milieu de culture sans endommager les particules de phages, ni introduire des bulles qui pourraient être confondues avec des plages de lyse.

Note : Il est important de compléter l'ajout des phages dilués et la bactérie hôte, le mélange et le versement de la couche fondue avant que l'agar ne commence à solidifier. Il est préférable d'arrêter la distribution de la couche supérieure sur la couche inférieure avant que la solidification partielle n'ait eu lieu. Cette solidification partielle peut être visualisée comme une surface rugueuse avec de petites granules.

8. En utilisant un embout de pipette neuf pour chaque tube de dilution, répéter l'étape 7 pour préparer et verser les couches supérieures pour les dilutions de phages restantes.

9. Laisser la couche supérieure se solidifier pendant 30 minutes, avant d'incuber les boîtes de Petri à l'envers en un seul étage, à la température désirée.

Note : Pour des bactéries à croissance rapide telle que *E.coli*, les plages sont souvent visibles en 4 heures. Pour certaines bactéries telles que *Bacillus cereus*, la surcroissance de plages survient et l'énumération doit être faite le plus tôt possible.

10. Continuer l'incubation pendant 18-24 h et énumérer les plages de lyse sur les boîtes de Petri ayant 30-300 plages.

Note : Les petites plages peuvent être énumérées précisément dans les centaines. Il est plus difficile de compter précisément de larges plages de lyse telle que celles produites par les phages T7.

11. Déterminer la titration de la préparation originale de phages en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre de plages} \times 10 \times \text{réciproque de la dilution énumérée} = \text{ufp.mL}^{-1} \quad (8)$$

Annexe 3 : Méthode d'isolation de la bactérie hôte

La méthode d'isolation de la bactérie hôte nécessite la souche bactérienne hôte, du bouillon liquide de TSB, de la poudre de TSA (« Tryptic Soy Agar », soit gélose trypticase de soja) et des boîtes de Petri stériles de 9 cm de diamètre. Il est important de s'assurer que la souche bactérienne hôte des phages soit une culture pure, et pour cela il est recommandé d'isoler une colonie sensible unique et de constituer un stock maître qui sera lyophilisé et surgelé à une température inférieure à -70°C [213].

La méthode d'isolation de la bactérie hôte se déroule en 3 étapes qui durent en tout 3 jours :

Jour 1 : Faire des étalements de la bactérie hôte sur une boîte de Petri de TSA et incuber la boîte de Petri à l'envers en conditions optimales de croissance. L'objectif étant d'obtenir des colonies isolées qui seront utilisées pour tester la sensibilité des phages

Jour 2 : Appliquer 100 µl de lysat de phages sur une boîte de Petri de TSA. Commencer par un côté de la boîte de Petri et strier la partie aliquotée de phages à travers la boîte de Petri pour former une ligne droite, continue et uniforme. Prélever une colonie bactérienne isolée avec un cure-dent stérile et strier la bactérie à travers la boîte de Petri, formant une ligne droite perpendiculaire croisant l'échantillon de phages. Il est possible de tester 8 colonies bactériennes par boîte de Petri. Incuber les boîtes de Petri à l'envers, pendant une nuit, sous conditions optimales de croissance de la bactérie hôte.

Jour 3 : Identifier les isolats de bactéries qui ont été lysés par les phages tel que démontré par l'absence de croissance lorsque ces bactéries ont été au contact des phages. Ceci signifie que les isolats de bactéries sont sensibles aux phages et sont un hôte approprié. Les isolats de bactéries ayant poussé tout au long de la ligne droite ne sont pas sensibles aux phages et doivent être rejetés.

Annexe 4 : Méthode d'énumération de la bactérie hôte

Nous avons revu, à la section 2.5.2.2, la méthode d'énumération de bactéries par cytométrie en flux, cependant nous utilisons la méthode microbiologique traditionnelle [260] dont les étapes expérimentales sont les suivantes :

1. Incuber la bactérie hôte pendant une nuit à 37°C.
2. Diluer la culture bactérienne à une concentration finale de 10^3 ufc.mL⁻¹. Faire une série de dilutions de facteur 10 en ajoutant 1 mL de culture à 9 mL de tampon jusqu'à obtenir deux dilutions de 10^{-1} et de 10^{-2} . S'assurer que les dilutions finales de l'essai sont dans un volume de 9 mL de TSB.
5. Faire un étalement sur boîte de Petri de 1 mL de chacune des deux dilutions en prélevant 0,2 mL dans cinq boîtes de Petri. Étaler avec un outil d'étalement stérile. Ne pas retourner les boîtes de Petri et laisser l'agar absorber l'inoculum.
6. Retourner les boîtes de Petri et incuber pendant une nuit à 37°C (dans le cas des bactéries *E.coli*). Compter les colonies.
7. Compter le nombre de bactéries en utilisant la formule :

$$\text{Nombre de bactéries (ufc.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{nombre de colonies}}{\text{Dilution étalée} \times \text{volume étalé}} \quad (9)$$

Pour les bactéries *E.coli* utilisées, la population est typiquement au nombre de 10^8 ufc.mL⁻¹ après 18 h de croissance à 37°C.

Annexe 5 : Énumération de phages en simple couche d'agar

Le protocole suivant s'applique à un lysat de phage contenant 10^8 à 10^{10} upf.mL⁻¹, avec une boîte de Petri par dilution. L'intervalle de dilutions et le nombre de répliquas de boîtes de Petri pour chaque dilution influenceront le nombre de boîtes de Petri nécessaires.

Note : L'énumération de phages peut se faire à partir d'aussi peu que trois dilutions (10^{-6} à 10^{-8}) pour un stock de phages contenant 10^8 à 10^{10} upf.mL⁻¹. Cependant, une large série de dilutions permet de vérifier la précision des dilutions initiales.

1. Verser 20-30 mL de milieu de culture par boîte de Petri, et lorsque la boîte est refroidie à température ambiante, ensacher et stocker les boîtes de Petri à 4°C. Les boîtes de Petri ensachées peuvent être stockées jusqu'à 4 mois.
2. Retirer 3 (ou plus) boîtes de Petri MNA ou TSA de leur stockage à 4°C et les faire sécher, à l'envers et inclinées dans un incubateur à 37°C pendant 1-2h ou partiellement découvertes sous une hotte à débit laminaire pendant 10-15 min. Numéroté les boîtes de Petri selon les dilutions à tester ; dans cet exemple, 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} .

Note : L'état du milieu de culture « inférieur » est très important. Il ne doit être ni trop sec ni trop humide, car ses deux facteurs affecteront négativement le développement des plages de lyse.

3. Pour chaque préparation de phages, monter une rangée de 8 tubes de dilutions stériles numérotés « -1 » à « -8 ») et ajouter 450µl de diluant stérile dans chaque tube.
4. Ajouter 50µl de phages non dilués au premier tube, et mélanger les phages et le diluant en déplaçant le liquide de haut en bas dans l'embout de la micropipette au moins trois fois. Répéter la procédure pour toutes les dilutions en transférant des volumes de 50µl et en changeant les embouts de micropipette entre les tubes.

5. Ajouter 100µl de culture bactérienne de la veille de préférence (contenant typiquement 10^8 à 10^9 ufc.mL⁻¹) aux dilutions de phages à mettre sur boîtes de Petri (ex. dilutions de 10^{-6} à 10^{-8}). Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque tube et mélanger par aspirations répétées, comme à l'étape 4.

Note : Le volume de la culture bactérienne nécessaire pour obtenir un tapis aggloméré avec des plages clairement visibles vient avec l'expérience, et varie typiquement entre 50 et 100µl.

6. Incuber les tubes à 37°C pendant 15-20 minutes pour permettre aux phages de s'attacher aux bactéries.

Note : Le temps d'incubation pour l'attachement dépend du système phages/bactéries.

7. Verser rapidement et étaler 200µl de chaque dilution inoculée sur la boîte de Petri correspondante (ex. -6, -7, et -8).

Note : Pour s'assurer de la formation d'un tapis bactérien uniforme, utiliser un enduiseur pour boîtes de Petri stérile en forme de L qui facilite un étalement rapide et uniforme de l'inoculum sur l'agar sans endommager la surface.

8. Laisser sécher les boîtes de Petri pendant 30 minutes sous une hôte à débit laminaire, avant de couvrir, mettre à l'envers et incuber les boîtes de Petri à 37°C pendant 20-24h.

9. Énumérer les plages de lyse contenant 30-300 plages, et calculer la titration de la préparation de phages non diluée, selon l'équation (10) :

$$\text{Nombre de plages} \times 5 \times \text{réciproque de la dilution énumérée} = \text{ufp.mL}^{-1} \quad (10)$$

Annexe 6 : Mesure de la force d'immobilisation des phages sur le papier

La mesure de la force d'immobilisation des phages sur la surface du papier a été utilisée dans le cadre de l'expérience d'influence des différents types de phages, décrite au chapitre des travaux futurs. Les matériels utilisés sont les bactériophages, boîtes de Petri de TSA pré-préparées, milieu semi-solide de TSA (0.5% d'agar), bouillons de TSB pré-préparés, tampon CM, inoculum de la bactérie hôte après 18h de culture, disques de papier bioactifs de 2,54 cm de diamètre, tubes stériles, tubes de micro-centrifugation stériles, pipettes et embouts de pipette stériles.

Étapes expérimentales :

1. Introduire des disques de papier bioactif de 2,54 cm de diamètre dans des tubes de 5 mL d'eau stérile et stocker à température ambiante pendant 24h.
2. Faire des tests de plages de lyse à 4h et à 24h pour déterminer la libération des phages du papier :
 - 2.1. Préparer des aliquotes de 450µl de solution tampon CM dans des tubes de micro-centrifugation.
 - 2.2. Transférer 50µl de la suspension à la première aliquote de 450µl et bien mélanger pour obtenir une dilution 10^{-1} .
 - 2.3. Transférer 50µl de la suspension précédente à la deuxième aliquote de 450µl et bien mélanger pour obtenir une dilution 10^{-2} .
 - 2.4. Poursuivre les étapes 2 et 3 pour atteindre des dilutions de 10^{-4} ou des dilutions permettant l'énumération de phages (les boîtes de Petri à considérer doivent avoir entre 50 et 300 plages de lyse). S'assurer que les embouts de pipette sont changés entre les différentes dilutions.

2.5. Préparer des boîtes de Petri en double couche d'agar comme décrit à la section 4.2.2 et étaler 10µl de chaque dilution sur des duplicatas de boîtes de Petri préalablement étiquetées.

2.6. Permettre l'absorption des dilutions étalées dans l'agar pendant 15 minutes environ.

2.7. Incuber les boîtes de Petri à l'envers pendant une nuit à 37°C (dans le cas de la bactérie *E.coli*).

2.8. Observer les boîtes de Petri pour identifier des plages de lyse isolées en fonction de leurs dilutions respectives.

2.9. Calculer le nombre de phages en utilisant la formule :

$$\text{Nombre de phages (ufp.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{nombre de plages de lyse}}{\text{Dilution étalée} \times \text{volume étalé}} \quad (11)$$